

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA

Metodologie di ricerca nelle malattie vascolari

Ciclo XXI

Settore scientifico disciplinare di afferenza: BIO10

TITOLO TESI

**Riparazione del danno vascolare ischemico ostruttivo del
miocardio mediante cellule staminali mesenchimali
sottoposte a stimolazione elettromeccanica in bioreattore**

Presentata da: Marco Govoni

Coordinatore Dottorato

Relatore

Chiar.mo Prof. Andrea Stella

Dott. Emanuele Giordano

Esame finale anno 2009

INDICE

Abbreviazioni

1 Introduzione

1.1	L'infarto del miocardio	6
1.2	Medicina rigenerativa ed ingegneria tissutale	7
1.2.1	<i>Cellule staminali</i>	9
1.2.2	<i>Biomateriali e polimeri in medicina rigenerativa</i>	11
1.2.3	<i>Bioreattori</i>	19
1.3	Ingegnerizzazione del tessuto cardiaco	24

2 Materiali e metodi

2.1	Colture cellulari	25
2.1.1	<i>Cardiomioblasti ventricolari di embrione di ratto: cellule H9c2</i>	25
2.1.2	<i>Cellule staminali mesenchimali (MSCs) del midollo osseo</i>	25
2.2	Biopolimeri utilizzati	27
2.2.1	<i>Acido poli-L-lattico</i>	28
2.2.2	<i>Estere poli(ω-pentadecalattone)</i>	29
2.2.3	<i>Acido ialuronico esterificato: HYAFF-11[®]</i>	30
2.3	Bioreattore per coltura cellulare dinamica	32
2.3.1	<i>Camera di coltura</i>	33
2.3.2	<i>pH-metro</i>	38
2.3.3	<i>Controllore della CO₂</i>	38
2.3.4	<i>Case</i>	39
2.3.5	<i>Computer e scheda di acquisizione</i>	41
2.3.6	<i>Software di gestione del bioreattore</i>	42
2.4	Metodiche impiegate	45
2.4.1	<i>Isolamento e coltura di MSCs di ratto</i>	45

2.4.2	<i>Sterilizzazione degli scaffold elettrofilati</i>	45
2.4.3	<i>Test di vitalità e crescita cellulare: the Alamar Blue[®] assay</i>	45
2.4.4	<i>Test di vitalità e crescita cellulare: the MTT assay</i>	46
2.4.5	<i>Test di vitalità cellulare: the CFDA SE assay</i>	47
2.4.6	<i>Test di citotossicità indiretta: the sulforhodamine B (SRB) assay</i>	48
2.4.7	<i>Microscopia elettronica a scansione (SEM)</i>	49
2.4.8	<i>Microscopia elettronica a trasmissione (TEM)</i>	50
2.4.9	<i>Colorazione con Ematossilina Eosina (EE)</i>	50
2.4.10	<i>Immunoistochimica</i>	51
2.4.11	<i>Estrazione di proteine e Western Blotting</i>	53
2.4.12	<i>Estrazione di RNA totale e RT-PCR</i>	53
2.4.13	<i>Analisi statistica dei dati</i>	55
3	Scopo della ricerca	56
4	Risultati e discussione	
4.1	<i>Acido poli-L-lattico (PLLA) e poli(ω-pentadecalattone) (PPDL): polimeri innovativi per l'ingegneria dei tessuti</i>	57
4.1.1	<i>PLLA amorfo e semicristallino</i>	58
4.1.2	<i>PPDL</i>	61
4.2	<i>Coltura dinamica nel prototipo di bioreattore</i>	65
4.2.1	<i>Biomateriali utilizzati: prove di biocompatibilità</i>	65
4.2.2	<i>Sterilizzazione</i>	67
4.2.3	<i>Termostatazione</i>	68
4.2.4	<i>Parametri di stretching utilizzati</i>	71
4.3	<i>Coltura statica e dinamica</i>	72
4.3.1	<i>Studi di crescita cellulare di MSCs di ratto su HYAFF-11[®]</i>	72
4.3.2	<i>Analisi istocitomorfolologiche dei costrutti ingegnerizzati</i>	74
4.3.3	<i>Estrazione di proteine ed RNA totali cellule adese a scaffold</i>	79

5	Conclusioni	81
6	Bibliografia	83
7	Ringraziamenti	89

ABBREVIAZIONI

b: larghezza del vaso

bpm: battiti per minuto

CFU-F: Colony Forming Unit
Fibroblast

ECM: Matrice extracellulare

EE: Ematossilina/eosina

ES: Embryonic Stem Cells

gT: temperatura di transizione
vetrosa

h: altezza del vaso

HSC: Hembryonic Stem Cells

Hz: Hertz

IMA: Infarto del miocardio

ISO: International Organization for
Standardization

IT: temperatura di stabilità chimica
 μ : viscosità

MSC: Mesenchymal Stem Cells

MSF: Marrow Stromal Fibroblast

mT: temperatura di fusione

MTT: 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-
difenil tetrazolio bromuro

N: Newton

NSC: Neural Stem Cells

PCL: Policaprolattone

PGA: acido poliglicolico

PLA: acido polilattico

PLLA: acido poli-L-lattico

PPDL: polipentadecalattone

PTC: Positive Temperature
Coefficient

PVDF: Polivinilidendifluoruro

Q: portata del vaso

rpm: rotazioni per minuto

rT: temperatura di rammollimento

RT-PCR: Reverse Transcription
Polymerase Chain Reaction

SEM: Microscopio elettronico a
scansione

SRB: Sulforodamina B

TCA: acido tricloroacetico

TEM: Microscopio elettronico a
trasmissione

UV: raggi ultravioletti

UV-C: raggi ultravioletti di tipo C

1 – INTRODUZIONE

1.1 L'Infarto del miocardio

L'infarto del miocardico (IMA), ovvero la necrosi del muscolo cardiaco, causata da un'ischemica acuta conseguente all'ostruzione trombotica di un'arteria coronaria, è fra le principali cause di mortalità nei paesi industrializzati [1]. I più recenti dati pubblicati dall'ISTAT [2] relativamente alla sua prevalenza in Italia indicano che circa 120.000 persone all'anno subiscono un IMA nel nostro Paese. Circa 15.000 muoiono prima di essere raggiunti da un Medico. Altrettanti non sopravviveranno durante l'anno che segue all'infarto [metà di questi per complicanze sopravvenute durante il ricovero in urgenza - in particolare per aritmie (fibrillazione ventricolare)]. Malgrado questo quadro rimanga drammatico, i dati epidemiologici mostrano che la mortalità acuta è stata progressivamente ridotta dagli interventi che permettono il ripristino del flusso ematico attraverso il vaso ostruito. La riperfusione del tessuto - mediante trombolisi, angioplastica o by-pass aorto-coronarico - [3] [4] ha dimostrato un'efficacia tanto maggiore quanto più presto viene garantita dopo l'infarto. Anche in un sopravvissuto a IMA, la parete ventricolare colpita da infarto va comunque incontro a necrosi con conseguente riduzione della funzione contrattile, per via di una progressiva sostituzione con tessuto cicatriziale. Questo comporta nel tempo il sopraggiungere di un'invalidità che nei casi più gravi determina il cosiddetto scompenso cardiaco, definibile come l'incapacità da parte del cuore di pompare sangue sufficiente alle esigenze funzionali dei tessuti e degli organi periferici [5]. Oltre un certo limite di rimodellamento dilatativo, un paziente post-infartuale può continuare a vivere solo sostituendo l'organo: il trapianto cardiaco è l'unica possibile terapia in questi casi [6] [7] [8]. Si deve tuttavia riconoscere che un intervento così importante non può essere considerato alla portata di ogni paziente che ne necessita: l'indisponibilità di sufficienti organi sostitutivi e i costi elevati dell'intervento richiedono l'esplorazione di altre possibilità terapeutiche. Un nuovo approccio sostitutivo del trapianto tradizionale è emerso dagli studi sulle cellule staminali, che hanno arricchito nell'ultimo decennio le nostre conoscenze sulla biologia dello sviluppo e del differenziamento offrendoci nel contempo potenti strumenti per intervenire con un approccio riparativo alle più gravi malattie degenerative.

1.2 Medicina rigenerativa e ingegneria tissutale

L'enorme progresso delle conoscenze nel campo della biologia cellulare e delle biotecnologie ha consentito, negli ultimi anni, lo sviluppo di tecnologie mirate alla coltivazione ed alla ricostruzione *in vitro* di tessuti o organi, definendo una nuova branca di scienze biomediche conosciuta con il termine di "ingegneria dei tessuti" [9].

L'ingegneria dei tessuti è "un campo interdisciplinare che applica i principi dell'ingegneria e delle scienze della vita allo sviluppo di sostituti biologici per ristabilire, mantenere o migliorare la funzione di tessuti e organi danneggiati" [10].

L'obiettivo di questa tecnologia è quello di espandere cellule *ex vivo* su matrici polimeriche biocompatibili tridimensionali (scaffold) da utilizzare nella riparazione di lesioni e rigenerazione di tessuti; la completa colonizzazione dello scaffold darà origine a un costrutto pseudotessutale *in vitro*, che potrà essere impiantato *in vivo* nell'uomo [11].

È possibile distinguere gli impianti, a seconda dell'organismo dal quale originano, in *allograft* quando le cellule, i tessuti o i tessuti ingegnerizzati derivino da un altro individuo della stessa specie, *xenograft* se invece derivano da un'altra specie (p. es. valvole cardiache devitalizzate da maiale o ricavate da pericardio bovino) e *autograft* se derivano dallo stesso individuo.

La metodologia standard per l'ingegnerizzazione di un tessuto per l'impianto su esseri umani prevede l'isolamento di una linea cellulare specifica tramite una biopsia, effettuata o direttamente sul paziente o su donatore compatibile, e una successiva semina di tali cellule su scaffold al fine di coltivare il costrutto in condizioni specifiche (e ripetibili) per generare un tessuto il più possibile omogeneo (fig. 1.1); infine il costrutto, costituito dallo scaffold e dalle cellule cresciute a bordo, verrà collocato nel paziente al fine di ricostruire o riparare il tessuto danneggiato [12]. Queste strutture bioartificiali rappresentano la seconda generazione di sistemi di sostituzione di organi e tessuti. La prima generazione era essenzialmente costituita da organi artificiali tradizionali (reni, macchina cuore-polmoni, protesi valvolari cardiache, pacemakers cardiaci, protesi di articolazione ileo-femorale e ginocchio), la cui alternativa clinica era, ed è tuttora, il trapianto di organi umani ottenuti da donatori. L'ingegneria tissutale rappresenta una evoluzione di tali interventi terapeutici consentendo la possibilità di associare la

potenzialità del trapianto di cellule viventi con la tecnologia degli organi artificiali per la realizzazione di strutture funzionali [13].

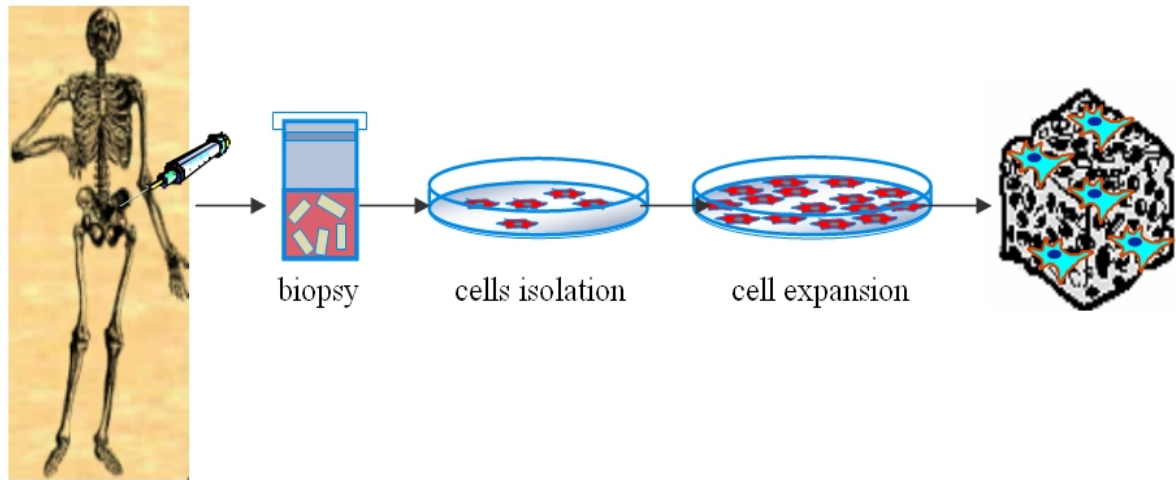


Fig. 1.1: Preparazione di un tessuto ingegnerizzato (schema).

Non solo: nel caso fossero state utilizzate cellule autologhe per la coltura *in vitro* del tessuto, al fine di impiantarlo sul paziente una volta rigenerato, eliminando le reazioni immunitarie sempre presenti (tranne in alcuni casi limitati) quando parti di tessuto od organi vengano trapiantati tra individui diversi anche della stessa specie, si potrebbe avere a disposizione in tempi brevi veri e propri pezzi di ricambio per l'organismo, identici agli originali, rimuovendo il problema di disponibilità di organi e il loro rigetto.

Di fondamentale importanza sono la comprensione delle interazioni cellula-substrato, del trasporto di biomolecole all'interno delle matrici, nonché lo sviluppo di tecnologie per il controllo dei parametri chimico-fisici-meccanici (bioreattori); inoltre, è importante che lo scaffold usato per la crescita sia biodegradabile o bioriassorbibile per permettere una graduale scomparsa del supporto dopo un certo tempo dal suo contatto con l'ambiente biologico durante la formazione del nuovo tessuto ingegnerizzato [14].

Lo stato attuale della disciplina dell'ingegneria dei tessuti non ha ancora superato l'utilizzo di protesi non biologiche per ridare funzionalità ai tessuti e agli organi danneggiati, ma ottimi risultati sono stati già raggiunti in applicazioni specifiche, come la produzione di epidermide o di cornee artificiali, o gli interventi che favoriscono la rigenerazione ossea. Ci si aspetta che questa tecnica consenta in

tempi brevi la realizzazione in laboratorio di tessuti più complessi fino a dare origine a vere e proprie parti di organi [15].

L'ingegneria tissutale, come già affermato in precedenza, è uno dei principali settori della ricerca nel campo delle biotecnologie degli ultimi anni, ed è caratterizzata dall'utilizzo integrato di cellule con elevata capacità differenziativa (cellule staminali) opportunamente isolate da organi e/o tessuti, biomateriali che forniscono la superficie utile all'adesione cellulare e bioreattori che garantiscono condizioni ambientali e parametri chimico-fisici ottimali per il mantenimento e sviluppo della coltura cellulare stessa.

1.2.1 Cellule Staminali

Una cellula staminale è per definizione una cellula in grado di autorinnovarsi [16] generando una progenie con le stesse caratteristiche della cellula madre, differenziare in più linee cellulari e rigenerare *in vivo* il tessuto di origine.. Durante lo sviluppo e la vita, molti tessuti sono in grado di autoripararsi in seguito ad un danno: questo processo che conduce alla rigenerazione e alla riparazione dipende da una popolazione di cellule di riserva che si dividono lentamente per automantenersi ma che possono proliferare per fornire i precursori commissionati per uno specifico tipo di cellula differenziata [17] [18]. In base alla potenza, ovvero la capacità di dare origine a una o più specie cellulari esse si dividono in:

- singola cellula totipotente, capace di svilupparsi in un intero organismo e persino in tessuti extra-embrionali (blastocisti).
- pluripotenti, capaci di specializzarsi in tutti i tipi di cellule che troviamo in un individuo adulto ma non in cellule che compongono i tessuti extra-embrionali.
- multipotenti, in grado di specializzarsi unicamente in alcuni tipi di cellule.
- unipotenti, capaci di generare solamente un tipo di cellula specializzata.

Le cellule staminali vengono anche suddivise in due classi: cellule staminali embrionali, ricavate dalle cellule interne di una blastocisti (pluripotenti) [19], e

adulte [20], ovvero cellule non specializzate reperibili tra cellule specializzate di un tessuto specifico adulto (multipotenti, unipotenti).

Dalla blastocisti è possibile isolare le cellule del nodo embrionale e coltivarle in vitro ottenendo le cosiddette Embryonic Stem Cells (ES), la cui caratteristica principale è l'elevata capacità di differenziare in qualsiasi tipo cellulare. Le ES sono adatte per ottenere colture permanenti e possono differenziare in vitro in neuroni [21], muscolo liscio [22], muscolo scheletrico [23] e cardiomiociti [24].

Quando le ES sono coltivate come corpi embrioidi, che sono i primi aggregati cellulari che si formano dallo sviluppo *in vitro* di queste cellule, differenziano in varie linee cellulari tra le quali anche i fenotipi cardiaci [25]. I cardiomiociti derivanti dalle ES possono essere identificati all'interno dei corpi embrioidi poiché presentano attività contrattile e rappresentano circa il 5% della popolazione cellulare. Questi, dopo isolamento, possono essere trapiantati in modo stabile nel miocardio come dimostrato da vari autori [26] [27], anche se tra le cellule da trapiantare potrebbero essere selezionati altri fenotipi presenti nei corpi embrioidi che, a lungo termine, potrebbero influenzare la funzione cardiaca. Gli ostacoli principali all'uso delle ES per il trapianto nel miocardio sono la difficoltà di ottenere una popolazione pura e riproducibile di cardiomiociti ventricolari e le reazioni di rigetto. La possibilità di utilizzare cellule staminali embrionali umane per lo sviluppo di trapianti a carattere terapeutico ha generato inoltre una serie di dibattiti riguardanti gli aspetti etici dell'impiego di embrioni umani come materiale di partenza da cui ottenere cellule staminali. Questa controversia ha orientato gran parte della ricerca sullo studio di cellule staminali adulte, ed in particolare derivanti dal midollo osseo, come alternativa all'impiego di cellule di origine embrionale. Le cellule staminali adulte o somatiche sono presenti in diversi tessuti e anche se in numero minore rispetto alle embrionali, anch'esse rispondono ai criteri caratteristici delle cellule staminali. La possibilità che le cellule staminali adulte possano transdifferenziare in più tipi cellulari è stata valutata da più autori. I primi esperimenti sono stati eseguiti utilizzando cellule staminali neurali marcate con β -galattosidasi, le quali sono state coltivate insieme a mioblasti o a cellule derivanti dai corpi embrioidi. Dopo 4-5 giorni le cellule muscolari esprimevano la β -galattosidasi, indicando che probabilmente segnali rilasciati dai mioblasti potevano aver determinato il differenziamento delle staminali in senso muscolare. Una seconda ipotesi prevede invece la possibilità che si sia verificata una fusione

cellulare tra le staminali neurali e i mioblasti o i corpi embrioidi [28]. Successivamente altri autori hanno dimostrato la capacità delle cellule staminali neurali e del midollo osseo di fondersi con cellule staminali embrionali (ES) ottenendo cellule tetraploidi [29] [30]. Risulta quindi problematico stabilire se il fenomeno di fusione può essere interpretato come transdifferenziamento anche alla luce della bassa percentuale di cellule tetraploidi che si formano a seguito di questo processo. La popolazione meglio studiata tra le cellule staminali dell'adulto sono le cellule staminali emopoietiche (HSC), di facile isolamento, sono in grado di differenziare in tutti gli elementi maturi del sangue e di ripopolare il sistema ematopoietico in un animale o in un uomo mieloablato [31]. Studi successivi hanno poi messo in evidenza che nell'individuo adulto sono presenti altre popolazioni cellulari che rispondono a tutti i requisiti di staminalità sopracitati e che quindi potevano essere annoverate nella categoria delle cellule staminali adulte quali: cellule staminali neurali (NSC) [32], cellule staminali epidermiche [33] e cellule staminali mesenchimali (MSC) [34]. Altre cellule vengono poi definite staminali quali: le cellule staminali corneali [35] e gli angioblasti o cellule staminali endoteliali [36] anche se sono in grado di differenziare in un unico tipo cellulare. Negli ultimi 10 anni la ricerca scientifica si è orientata sempre più verso lo studio delle potenzialità delle cellule staminali adulte poiché in un'ottica di terapia legata al trapianto cellulare, rispetto alle staminali embrionali, non presentano problemi di natura etica relativi all'utilizzo degli embrioni a scopo terapeutico e potendo essere isolate dal paziente stesso evitano i fenomeni di rigetto post-trapianto. Il vantaggio potenziale delle cellule staminali adulte quindi riguarda la loro capacità di essere isolate, di duplicarsi un numero elevato di volte e di essere in grado di differenziare in altri tipi cellulari del corpo. Questo permette di avere a disposizione una strategia per ottenere una popolazione di cellule precursori, che possono essere impiegate per la terapia rigenerativa di tessuti adulti danneggiati per i quali non esistono altre fonti endogene o sufficienti [37].

1.2.2 Biomateriali e polimeri in medicina rigenerativa

“Si definisce biomateriale un materiale concepito per interfacciarsi con i sistemi biologici per valutare, dare supporto o sostituire un qualsiasi tessuto, organo o funzione del corpo” (2nd Consensus Development Conference, Chester, 1986).

Questa definizione esclude pertanto i materiali viventi, quali organi trapiantati, ma include i tessuti di origine biologica trattati e non più viventi [38].

I biomateriali hanno risposto al bisogno dell'uomo di sostituire od integrare tessuti ed organi, non più attivi dal punto di vista funzionale o metabolico, danneggiati da eventi patologici o traumatici. Il numero delle loro applicazioni è cresciuto notevolmente in questi anni e spaziano dagli organi artificiali, alle protesi, ai dispositivi medici più usuali, come i fili per sutura chirurgica (fig. 1.2). Alcune di esse sono permanenti, altre temporanee, altre ancora periodiche come nel caso della dialisi [39].

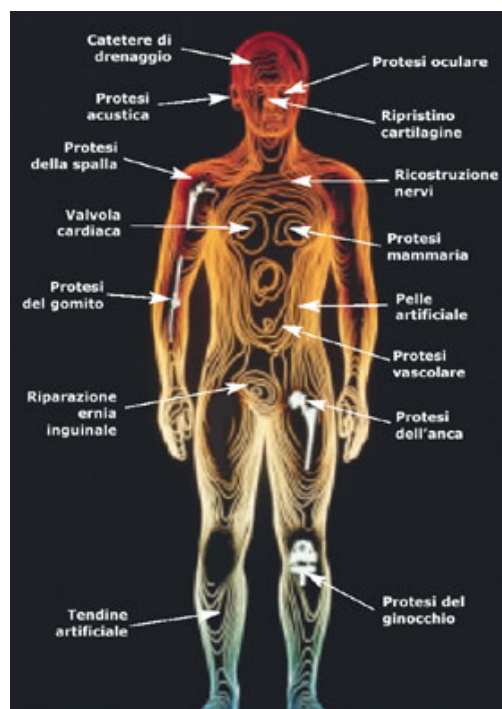


Fig. 1.2: Applicazioni biomediche dei biomateriali.

Le modalità di utilizzo determinano quindi la scelta di un materiale rispetto a un altro; inoltre, la comprensione della relazione esistente tra *struttura-proprietà-funzione* dei biomateriali costituisce una sfida per la moderna scienza dei materiali in quanto è fondamentale per la progettazione e realizzazione di costrutti, in grado di sostituire o riparare tessuti danneggiati, finalizzati ad ottimizzare trattamenti terapeutici per la cura di patologie [40] [41].

Le prestazioni dei materiali impiegati in campo medico sono valutate in base alla loro *biofunzionalità* e *biocompatibilità*. La *biofunzionalità* si riferisce alle proprietà

che un dispositivo deve avere per riprodurre una determinata funzione dal punto di vista fisico e meccanico; la *biocompatibilità*, invece, alla capacità del dispositivo di continuare a svolgere quella determinata funzione durante tutta la vita utile dell'impianto ed è strettamente connessa, quindi, alle interazioni tra i biomateriali ed i tessuti con cui vengono a contatto; è quindi un aspetto che riguarda tutti i fenomeni di natura chimica e biologica che possono indurre alterazioni dannose sia per i tessuti naturali, sia per i materiali impiegati per la costruzione dei dispositivi a contatto con tali tessuti.

Per la biocompatibilità di un dispositivo è necessario, ma non sufficiente, che il materiale con il quale è costruito sia biocompatibile.

La biocompatibilità di un materiale viene normalmente verificata utilizzando una serie graduale di test (*iniziale, secondario, di utilizzo*) mirati al controllo di caratteristiche sempre più specifiche per il tipo di uso previsto. In particolare, il test *iniziale* rappresenta lo stadio più importante e generale in quanto consente di escludere quei materiali che a contatto di qualsiasi tessuto, risultino dannosi, pregiudicandone ogni uso in campo medico-biologico.

Il test iniziale è il più semplice, ripetibile e meno costoso tra i test di biocompatibilità e viene svolto *in vitro* ponendo il materiale in esame a contatto (diretto o indiretto) con una coltura cellulare di riferimento di cui si valuta l'eventuale sofferenza cellulare.

I parametri da considerare sono vari e comprendono: citotossicità, citostasi, lisi della membrana cellulare, mutagenesi e cancerogenesi.

Il parametro che viene testato per primo e che pregiudica il proseguimento dell'analisi è senz'altro la citotossicità, ovvero la capacità del materiale di interagire con l'ambiente di coltura e con le cellule determinandone la morte. Questa interazione dannosa può avvenire anche per rilascio da parte del materiale testato di sostanze tossiche, quali residui di catalizzatori, ioni, o monomeri come nel caso di polimeri.

L'altro aspetto fondamentale è la citostasi, cioè la diminuita capacità di replicazione cellulare in presenza del biomateriale, che lo rende inadatto, in medicina, a fini rigenerativi e per protesi mirate alla ricostruzione del tessuto originario.

Per ogni test è necessario eseguire sempre in parallelo un controllo che consiste nello svolgimento del test anche su un materiale di riferimento.

Dal confronto tra il controllo e il materiale di interesse è possibile trarre delle conclusioni su quest'ultimo; i saggi di questo tipo sono dunque semiquantitativi, dato che non forniscono risultati assoluti, bensì relativi alla stessa serie. I test iniziali presentano il vantaggio di essere veloci ed economici, di avere una maggiore sensibilità dei test successivi verso i materiali tossici, e di essere standardizzabili nelle procedure; tuttavia presentano il problema di valutare gli effetti solo su un tipo di cellula per volta, di utilizzare cellule diverse da quelle del tessuto di un possibile organismo ospite e di non considerare i fenomeni infiammatori che nascono dal contatto con un organismo.

In caso di materiali finalizzati all'utilizzo medicale in vitro, i test iniziali sono sufficienti a discriminare i materiali utilizzabili da quelli dannosi.

In caso di utilizzo sull'uomo i materiali che superano positivamente i test iniziali vengono sottoposti ai test secondari e, in ultimo, ai test di utilizzo.

I test secondari sono finalizzati ad analizzare i fenomeni infiammatori e le risposte immunitarie; per questo i materiali vengono impiantati per un tempo che si protrae da alcune settimane ad anni. Alla fine del tempo stabilito l'animale viene sacrificato e viene valutato l'eventuale danno riportato.

Superati i test secondari i materiali vengono sottoposti a test di utilizzo per verificare la loro effettiva utilità per la specifica funzione richiesta, a questo scopo i materiali vengono impiantati in animali di grossa taglia a svolgere la funzione per la quale sono stati progettati e, dopo l'approvazione ministeriale, vengono sperimentati anche sull'uomo.

I biomateriali polimerici vengono ampiamente usati in medicina sia per parti protesiche sia per componenti strumentali, hanno infatti caratteristiche meccaniche idonee per la sostituzione di tessuti, sono facili da lavorare e possono essere ingegnerizzati in una innumerevole quantità di varianti per la loro caratteristica struttura chimica modulare.

I polimeri sono composti da molecole molto lunghe e flessibili, formate dalla ripetizione di unità semplici, dette unità monomeriche, unite tra loro attraverso legami covalenti. Le lunghe catene sono tenute insieme da forze di Van der Waals o da legami idrogeno o ancora da legami covalenti chiamati "cross links". Inoltre ogni catena può possedere gruppi laterali e rami che determinano l'organizzazione globale delle catene. Spesso i polimeri si possono presentare con un parziale

ordine delle catene, assumendo la cosiddetta struttura semicristallina dove regioni cristalline ordinate sono immerse in una matrice amorfa.

Parametro fondamentale dei polimeri è il grado di polimerizzazione, cioè il numero medio di unità ripetitive all'interno di una molecola: all'aumentare del grado di polimerizzazione diminuisce la mobilità relativa delle catene e si modificano le caratteristiche meccaniche del polimero stesso.

Altra caratteristica importante per il comportamento meccanico è la presenza nelle macromolecole di ramificazioni e legami crociati che, a parità di grado di polimerizzazione, limitano i movimenti relativi tra le molecole.

Per lo studio di questi materiali è importante conoscere anche le loro "temperature caratteristiche" vale a dire il loro comportamento in funzione della temperatura. Nel caso di un polimero lineare amorfo, all'aumentare della temperatura si osservano due transizioni in corrispondenza di due intervalli di temperatura differenti.

La prima è detta transizione vetrosa e si manifesta ad una temperatura detta temperatura di transizione vetrosa (gT): il materiale passa da uno stato vetroso rigido ad uno stato gommoso.

La seconda transizione si manifesta alla temperatura detta temperatura di rammollimento (rT): il polimero passa dallo stato gommoso allo stato liquido. In quest'ultimo stato diventa lavorabile, anche se è molto viscoso.

Oltre la temperatura di stabilità chimica (IT), il polimero si degrada in quanto si rompono i legami chimici e quindi si è in presenza di un'altro materiale. Nel caso di un materiale polimerico parzialmente cristallino, la transizione vetrosa modifica poco le proprietà meccaniche, che invece decadono moltissimo in corrispondenza della temperatura di fusione (mT) quando il reticolo cristallino viene distrutto. Nel caso, infine, di un polimero reticolato (presenza di legami crociati) termoindurente (indurisce all'aumentare della temperatura) non ci sono significative variazioni di proprietà con la temperatura fino al limite di stabilità chimica. È importante considerare con attenzione queste temperature per poter stabilire un'adeguata procedura di sterilizzazione o disinfezione che non porti ad un danneggiamento del materiale: molto spesso infatti non è possibile sterilizzare a caldo o con radiazioni i polimeri senza alterarne le proprietà.

Il termine biodegradazione è associato ai materiali polimerici riassorbibili dall'organismo e avviene principalmente in due modalità: passivamente per idrolisi chimica spontanea e attivamente per opera di reazioni enzimatiche.

Molti poliesteri alifatici utilizzati in applicazioni mediche degradano principalmente per idrolisi non enzimatica [42] [43].

Aspetto cruciale della degradazione è la sua tempistica, che dipende dalla qualità dei legami chimici nelle catene polimeriche, dall'idrofilicità, dal peso molecolare, dalla cristallinità, dalla composizione nel caso dei copolimeri e dalla presenza di composti a basso peso molecolare (diluenti).

Fondamentale è anche il fenomeno di perdita di stabilità meccanica durante la degradazione, che può avvenire troppo in fretta per gli scopi previsti e può portare all'accumulo di prodotti delle degradazioni in concentrazioni tali da risultare tossici. Tuttavia, l'interesse verso materiali polimerici biodegradabili è cresciuto molto nell'ultimo decennio perché essi posseggono due vantaggi fondamentali che i materiali non degradabili non hanno:

- in primo luogo non provocano reazioni croniche da corpo estraneo, dato che vengono gradualmente riassorbiti dal corpo umano e non lasciano tracce o residui permanenti nei siti di impianto;
- in secondo luogo alcuni di essi sono in grado di rigenerare i tessuti attraverso l'interazione tra i prodotti della loro biodegradazione, cioè la rottura dei legami chimici nella catena principale e nei gruppi laterali a causa dell'attacco ionico o enzimatico, e le cellule dell'organismo ospite (per esempio i monociti/macrofagi).

L'uso di polimeri biodegradabili come supporto (scaffold) sia per la crescita di cellule o tessuti *in vitro* (ingegneria tissutale), sia per rigenerare tessuti in vivo, è diventato un aspetto importante di ricerca e sviluppo, che estende il campo di utilizzo dei polimeri biodegradabili oltre i loro usi tradizionali di suture e rilascio controllato di farmaci.

I supporti utilizzati in ingegneria tissutale e in medicina rigenerativa consentono l'adesione cellulare e il conseguente controllo della crescita in modo da ottenere una forma finale prestabilita.

Nonostante siano stati studiati per questo uso numerosi polimeri di origine naturale come l'acido ialuronico o il collagene, i poliesteri lineari alifatici di sintesi biorassorbibili - come l'acido poliglicolico (PGA) e il polilattico (PLA) - e i loro

copolimeri hanno attirato un grande interesse per la possibilità di modificare facilmente le loro proprietà e per la versatilità dei loro processi produttivi.

I polimeri biorassorbibili in commercio sono illustrati con le loro caratteristiche meccaniche nella tabella sottostante.

Polymer	Crystallinity	T _m (°C)	T _g (°C)	T _{dec} (°C)	Fiber		
					Strength (MPa)	Modulus (GPa)	Elongation (%)
PGA	High	230	36	260	890	8.4	30
PLLA	High	170	56	240	900	8.5	25
PLA	None	—	57	—	—	—	—
Polyglactin910 ^a	High ^c	200	40	250	850	8.6	24
Polydioxanone	High	106	<20	190	490	2.1	35
Polyglyconate ^b	High ^c	213	<20	260	550	2.4	45
Poliglecaprone25 ^d	—	<220	-36~15	—	91,100 ^e	113,000 ^e	39

^a Glycolide per lactide = 9/1.

^b Glycolide per trimethylene carbonate = 9/1.

^c Depending on the copolymer composition.

^d 2/0 size Monocryl (glycolide-ε-caprolactone copolymer).

^e PSI unit.

Source: Kimura, Y., 1993. *Biodegradable Polymers*. In: *Biomedical Applications of Polymeric Materials*, T. Tsuruta, T. Hayashi, K. Kataoka, K. Ishihara, and Y. Kimura, Eds., CRC Press, Boca Raton, FL; Chu, C.C., von Fraunhofer, J.A., and Greisler, H.P., 1996. *Wound Closure Biomaterials and Devices*. CRC Press, Boca Raton, FL.

Gli scaffold sono i supporti sui quali vengono seminate le cellule per la ricostruzione di tessuti; questi si possono suddividere in diversi gruppi a seconda della natura del materiale che li costituisce e della loro struttura.

Gli scaffold possono derivare da materiali naturali, quali matrice extracellulare (ECM) e proteine (collagene), la fibrina e l'acido ialuronico o da materiali sintetici come ad esempio il polilattide (PLA) ed il poliglicolide (PGA).

I materiali di sintesi hanno il vantaggio di consentire il controllo delle proprietà chimiche, fisiche e meccaniche del supporto e di dare a questo la forma desiderata; lo svantaggio è che, essendo di origine non biologica, possono non favorire l'adesione cellulare.

Al contrario i materiali naturali non hanno questo tipo di inconveniente, ma solitamente hanno caratteristiche meccaniche non idonee per funzionare da supporto ed inoltre tendono a degradarsi troppo velocemente.

In base alla struttura gli scaffold possono essere divisi in bidimensionali, utilizzati per generare tessuti formati da un sottile strato cellulare (ad esempio rigenerazione dell'epidermide), ed in tridimensionali, solitamente molto porosi al fine di facilitare la crescita cellulare in tutto lo spessore del supporto.

Alcuni esempi di origine naturale sono l'Ultrafoam® (Radisic et al., 2004) che è una spugna di collagene, ed il Gelgoam® (Pharmacia & Upjohn Co., Kalamazoo, MI) che consiste in una spugna gelatinosa ottenuta da pelle suina (fig. 1.3).



a)



b)

Fig. 1.3: Scaffold in materiale di origine naturale: a) spugna in collagene; b) matrice gelatinosa ottenuta da pelle di suino purificata.

Viene infine riportato un metodo di preparazione degli scaffold in cui il polimero viene estruso in microfilamenti (15 μm di diametro), intrecciato in fibre multifilamento (100 microfilamenti per fibra) ed infine tessuto per ottenere una lavorazione a maglia (knitted scaffold) (fig. 1.4).



Fig. 1.4: Knitted scaffold.

Per la scelta del polimero più adatto bisogna considerare le seguenti specifiche:

- Biocompatibilità;
- Proprietà meccaniche: deve essere mantenuta la stabilità meccanica per un periodo adeguato in modo da tenere la struttura del supporto richiesta per la crescita cellulare;
- Riproducibilità: mirando ad un uso clinico il biomateriale e la struttura devono essere riproducibili con un metodo di realizzazione facilmente controllabile;
- Sterilizzabilità: fondamentale per evitare contaminazioni;
- Proprietà chimico-fisiche: per garantire le funzioni cellulari la struttura dovrà possedere adeguate proprietà di: porosità per consentire la diffusione delle

cellule all'interno, idrofilicità per favorire l'adesione, elasticità per trasmettere la forza contrattile, area superficiale, carica superficiale.

I polimeri sintetici più usati in questo settore sono i bioerodibili, i quali, sotto l'azione aggressiva dei fluidi interni dell'organismo, si decompongono e vengono riassorbiti. Bisogna valutare attentamente l'eventuale tossicità dei monomeri (che si liberano se il polimero si erode) e i tempi di riassorbimento (che devono essere almeno pari a quelli di rigenerazione del tessuto per mantenere le proprietà meccaniche e la struttura nel transitorio). I più usati sono l'acido polilattico (PLA), il policaprolattone (PCL), l'acido poliglicolico (PGA) e i loro copolimeri.

PGA	PLA	PCL
Idrofilico, Buone proprietà meccaniche, si degrada in 4 settimane	Idrofobico duraturo	idrofobico ottima permeabilità (rilascio di sostanze)

1.2.3 Bioreattori

I bioreattori sono strumenti nati per la fermentazione e la coltivazione dei batteri e, successivamente, sono stati applicati nel campo dell'ingegneria tissutale [44]. Il loro obiettivo è ricreare *in vitro* condizioni tipiche dell'ambiente biologico presente all'interno dell'organismo, consentendo il controllo dei parametri chimico-fisici e meccanici che ne influenzano lo stato, quali il pH, la concentrazione di gas (ossigeno e anidride carbonica), l'umidità e la temperatura, per una precisa caratterizzazione della coltura; in aggiunta essi permettono anche la stimolazione fisica e meccanica del costrutto tissutale durante il periodo di coltura [45]. Una caratteristica generale di un tale dispositivo è la capacità di generare pattern di flusso nel mezzo di coltura, instaurando moti convettivi che consentono la perfusione di tutte le cellule, che saranno quindi meglio raggiunte dai nutrienti favorendo una più rapida rimozione dei metaboliti di scarto, in maniera differente da quanto avviene nelle colture statiche nelle quali tutto è affidato alla semplice diffusione. Prima ancora di considerare la progettazione del bioreattore esistono

delle specifiche tecniche che devono essere rispettate, infatti è necessario che l'ingombro sia ridotto, che tutti i componenti del dispositivo a contatto con il mezzo di coltura siano sterilizzabili e che tale sterilità venga mantenuta, che il numero e la complessità dei passaggi per il montaggio e lo smontaggio siano limitati, che il dispositivo sia trasparente per consentire di visualizzare l'interno e che permetta l'utilizzo di scaffold e regimi di stimolazione variabili.

La sterilità del dispositivo è il primo aspetto delicato da considerare. Tutte le parti in silicone o in vetro vengono sterilizzate tramite autoclave a secco. Dopo l'assemblaggio del dispositivo il bioreattore è sottoposto a irraggiamento con raggi UV o viene trattato in ossido di etilene, se queste procedure non rischiano di modificare la struttura chimica del materiale polimerico che lo costituisce, il che potrebbe essere fonte di tossicità per le cellule.

Esistono diverse classi di bioreattori [46]:

- A flusso laminare;
- Ruotanti;
- Con stimolazione meccanica;
- Con stimolazione elettro-meccanica.

I bioreattori a flusso laminare sono costituiti da una camera dove scorre il mezzo di coltura, nella quale, sul fondo, è ancorato il substrato cellulare [47]. La velocità del fluido è tale da mantenerlo in condizioni di moto laminare. Il settore di maggiore applicazione di tali dispositivi è quello delle protesi vascolari, infatti l'intento è quello di simulare le condizioni di stress meccanico generato dal flusso presente all'interno dei vasi sanguigni. Tale condizione è dovuta a diversi fattori: allo *sforzo di taglio*, causato dal flusso del sangue tangente alla parete endoteliale che ricopre la parete interna del vaso, allo *stress tensile*, cioè la tensione sulla sezione circolare del vaso dovuta alla sua deformazione e allo *stress radiale*, dovuto alla pressione alla quale è sottoposto il sistema circolatorio. Questo regime di sollecitazione provoca la modifica della forma e della funzionalità delle cellule costituenti il vaso sanguigno, in modo da stimolare le cellule endoteliali ad allinearsi nella direzione di scorrimento e a svilupparsi in modo analogo a quello naturale. L'endotelio è infatti un monostrato biologicamente attivo di cellule che

rispondono alla variazione delle condizioni emodinamiche locali riorganizzandosi in modo da mantenere costante lo sforzo di taglio.

È infatti dimostrato che in regime di sforzo basso o con flusso turbolento si possono creare placche aterosclerotiche che non insorgono in regime di flusso laminare.

La relazione:

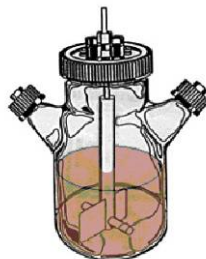
$$\tau = \frac{6Q\mu}{bh^2}$$

lega lo sforzo di taglio τ ad alcuni dei parametri caratteristici del vaso, dove Q è la portata del vaso, μ la viscosità, h e b rispettivamente altezza e larghezza del vaso stesso. Tali grandezze caratteristiche variano nel tempo al fine di mantenere costante τ . La modifica morfologica della cellula consiste nell'assumere forma più allungata e nel disporre il proprio asse maggiore lungo la direzione di scorrimento del flusso; ciò avviene grazie all'orientamento delle fibre di actina presenti nel citoscheletro.

Un'altra categoria di bioreattori è quella ruotante, a sua volta divisibile in due tipi in base alla disposizione del substrato cellulare all'interno. Un primo modello è lo Spinner-Flask (Carrier et al.) (fig. 1.5) [48], costituito da un contenitore di vetro nel quale è posta una paletta che ruota, solitamente a 50 rpm, e consente l'agitazione e il rimescolamento del medium di coltura attorno al un costrutto bidimensionale ancorato sul fondo senza possibilità di movimento. Il mezzo di coltura viene introdotto tramite appositi fori.



a)



b)

Fig. 1.5: Bioreattore Spinner-Flask; a) foto, b) schema.

Il bioreattore Spinner-Flask è stato progettato per risolvere uno dei principali problemi delle colture cellulari statiche *in vitro*, il trasporto dei metaboliti e dell'ossigeno necessari alla sopravvivenza della cellula e la rimozione dei cataboliti e dell'anidride carbonica. In assenza del rimescolamento del mezzo di coltura si crea un gradiente di ossigeno tra il costrutto e l'ambiente circostante che può portare alla morte delle cellule.

Un modello più complesso è quello a vaschetta ruotante (fig. 1.6), composto da una vaschetta cilindrica con una zona centrale cava e isolata dal resto del sistema tramite una membrana semipermeabile attraverso la quale viene immesso il medium di coltura e avvengono gli scambi di gas [49].

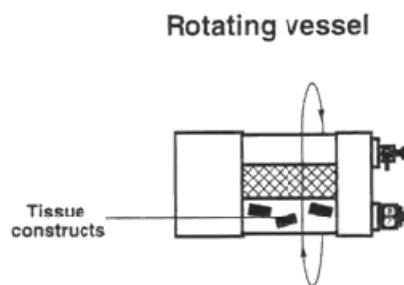


Fig 1.6: Bioreattore a vaschetta rotante.

Il substrato è lasciato libero di muoversi e questo gli consente di entrare in contatto con tutte le sostanze presenti nel mezzo. L'introduzione del mezzo avviene tramite tubi collegati alla membrana centrale. La rotazione deve essere regolata in modo da non provocare turbolenze o il distacco delle cellule dal supporto polimerico.

Il rimescolamento del mezzo provoca una maggiore crescita delle cellule e una loro più uniforme distribuzione, l'urto di questo con il substrato favorisce l'adesione, producendo un costrutto spesso completamente ricoperto da uno strato omogeneo di cellule.

Un terzo tipo di bioreattore associa alla perfusione forzata del costrutto una stimolazione di tipo meccanico che consente di indirizzare l'organizzazione, la composizione e la funzionalità del tessuto ingegnerizzato (fig. 1.7).

Tale sollecitazione favorisce la proliferazione e la distribuzione delle cellule, l'organizzazione della matrice extracellulare e l'orientamento delle strutture costituenti un tessuto miocardico ingegnerizzato [50] [51]

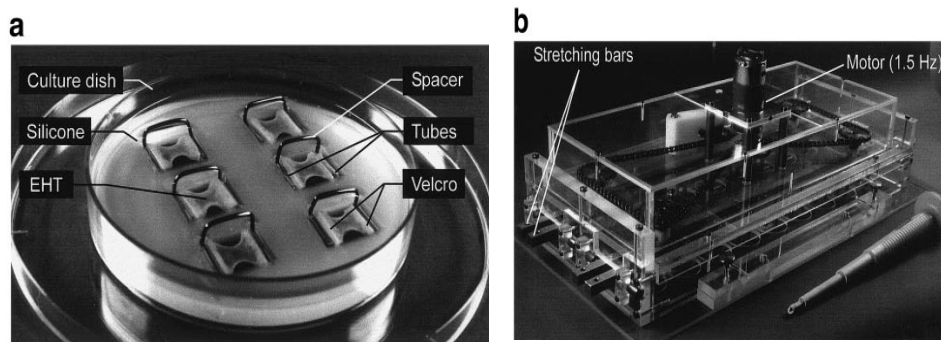


Fig 1.7: a) disco di coltura prima della sollecitazione meccanica. b) Dispositivo motorizzato per la stimolazione.

Questo tipo di sollecitazione consente di ottenere un tessuto con proprietà meccaniche molto superiori a quelle di un tessuto cresciuto in regime statico e più simile a un tessuto nativo. I costrutti utilizzati sono per lo più di forma rettangolare e vengono sottoposti a carichi ciclici uniassiali in direzione longitudinale. Solitamente il supporto è ancorato a un'estremità fissa mentre l'altra è agganciata ad un afferraggio in grado di spostarsi con deformazioni e frequenze differenti.

In letteratura è riportato un dispositivo composto da cinque bulbi di silicone sui quali viene bloccato un costrutto scaffold-cellule. I bulbi vengono ciclicamente gonfiati e sgonfiati tramite la loro connessione a serbatoi di aria compressa, il che comporta una deformazione ciclica applicata al tessuto fissato sopra i bulbi.

Esistono infine bioreattori in grado di fornire pattern di stimolazione elettrica e meccanica (fig. 1.8) [52]. La sollecitazione elettrica simula il comportamento di un cuore nativo e consente la contrazione sincrona del tessuto cardiaco.

La doppia sollecitazione meccanica ed elettrica provvede a riprodurre il comportamento di un cuore nativo.

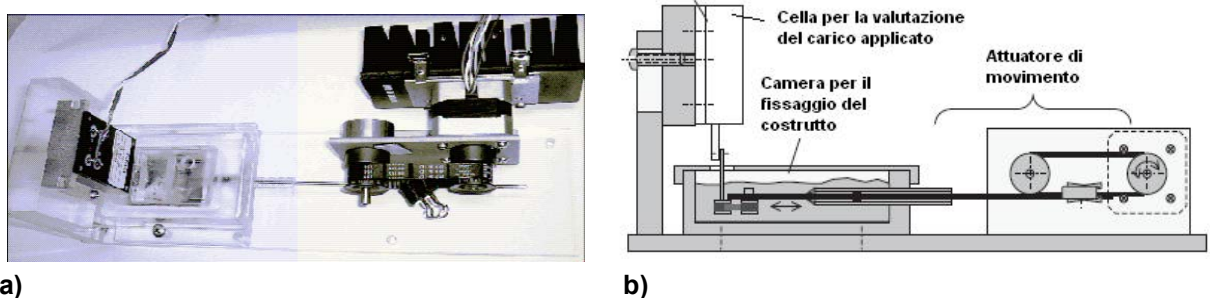


Fig 1.8: Dispositivo per stimolazione elettromeccanica: a) foto; b) schema dei componenti.

1.3 Ingegnerizzazione del tessuto cardiaco

La finalità dell'ingegnerizzazione del miocardio è la rigenerazione di porzioni di tessuto cardiaco che, a causa di eventi critici come quelli ischemici, abbiano perso la capacità contrattile [53] [54].

Per questo scopo è possibile seguire due diversi approcci, quello *in vitro* e quello *in vivo*.

Per l'approccio *in vivo* [55] sono attuabili tre diverse strategie: è possibile l'impianto di scaffold non seminati al fine di promuovere o facilitare una crescita di cellule endogene, oppure l'impianto di costrutti scaffold-cellule ad uno stadio nel quale le cellule non siano ancora differenziate – in modo che tale processo avvenga direttamente *in situ*, o infine il trapianto diretto di cellule nella zona del miocardio danneggiato – una delle strategie terapeutiche più promettenti, che tuttavia presenta spesso uno scarso successo principalmente a causa dell'incapacità delle cellule trapiantate di generare fibre miocardiche in numero clinicamente rilevante.

Graft di tessuto miocardio ingegnerizzato, ottenuti tramite la coltura di appropriati tipi cellulari su matrici di supporto e stimolati tramite l'utilizzo di un bioreattore fino a ottenere caratteristiche fisico-meccaniche simili a quelle del tessuto originale, si sono rivelati una valida alternativa alle strategie terapeutiche tradizionali [56].

Vantaggi significativi, associati all'impianto di costrutti cardiaci ottenuti *in vitro* deriverebbero soprattutto da un aumento nell'efficienza del trapianto, nella capacità del tessuto ingegnerizzato di integrarsi e rimodellarsi all'interno del tessuto ospite in risposta agli stimoli ambientali e nella possibilità di controllare la forma e le dimensioni del costrutto e il comportamento del tessuto, cosa non possibile per l'approccio *in vivo*. Lo svantaggio dei costrutti *in vitro* è che solitamente si ottengono tessuti poco robusti e molto sottili, al contrario di quanto avviene con l'approccio *in vivo* che consente la rigenerazione del tessuto *in situ* [57].

2 – MATERIALI E METODI

2.1 Colture cellulari

In questo studio sono state utilizzate due popolazioni cellulari entrambe derivate da *Rattus Norvegicus*: cardiomioblasti ventricolari embrionali (H9c2) e cellule staminali mesenchimali (MSC) di midollo osseo.

2.1.1 Cardiomioblasti ventricolari di embrione di ratto: cellule H9c2

Cardiomioblasti ventricolari di embrione di ratto (linea H9c2) (fig. 2.1a) ottenute dalla European Collection of Cells Cultures [25] sono stati impiegati nella caratterizzazione della metodica di semina di scaffold.

Questa linea cellulare immortalizzata, già parzialmente differenziata in senso cardiaco, presenta caratteristiche confrontabili con quelle espresse da cardiomioblasti embrionali, come assenza di gap junctions, caveole, tubuli T, miofibrille con sarcomeri organizzati, e presenza di reticolo endoplasmatico rugoso ben organizzato, superficie cellulare ricca di microvilli, correnti del Ca^{2+} di tipo L.

La coltura è mantenuta in terreno Dulbecco's Modified Eagle's Medium completo di penicillina/streptomina 100 U/mL, L-glutammina 0.1 µg/mL, siero bovino fetale al 20%, posta in incubatore a 37 °C in atmosfera di CO_2 al 5% ed il terreno viene generalmente sostituito ogni 2/3 giorni.

2.1.2 Cellule staminali mesenchimali (MSCs) del midollo osseo

Il midollo osseo post natale è un tessuto molle che si trova nell'interno cavo delle ossa ed è costituito dal tessuto ematopoietico e dallo stroma di supporto.

Inizialmente studiato perché rappresentava il microambiente in cui cellule di tipo ematopoietico si sviluppavano, Friedenstein et al. dimostrò come fosse possibile separare da esso la componente stromale per azione meccanica in modo da ottenere un gruppo di cellule che, a differenza delle cellule della linea ematopoietica, risultavano in grado di aderire alle piastre di coltura [58].

Queste cellule di struttura fibroblastoide, se seminate a bassa densità e in opportune condizioni di coltura, davano origine a colonie ognuna delle quali derivante da un singolo precursore cellulare inizialmente definito unità formante

colonia fibroblastoide CFU-F (Colony Forming Unit Fibroblast) o fibroblasti dello stroma midollare MSF (Marrow Stromal Fibroblast) [59]. Successivamente tale terminologia è stata abbandonata e sostituita con Cellule Stromali Midollari MSCs (Marrow Stromal Cells) o Cellule Staminali Mesenchimali MSCs (Mesenchymal Stem Cells) (fig. 2.1b).

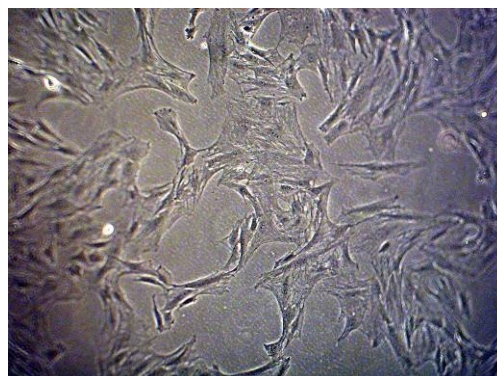
Le cellule staminali mesenchimali sono una popolazione cellulare pluripotente e se adeguatamente indirizzate possono dare origine a cellule con caratteristiche di vari tessuti come quello osseo, cartilagineo, adiposo, muscolare, cardiaco (per citare alcuni esempi). Una delle maggiori difficoltà che si incontra nell'utilizzo di queste cellule è la loro scarsa presenza nel midollo e quindi, per poter essere utilizzate, devono essere prelevate ed espanse in laboratorio per raggiungere un numero rilevante. Inoltre, va ricordato che non esiste un unico marker antigenico in grado di caratterizzare, come invece avviene per le staminali ematopoietiche (CD34), questo tipo cellulare ed attualmente non è stato ancora stilato un elenco completo ed universalmente riconosciuto dei marcatori antigenici in grado di caratterizzare le MSCs.

Le cellule staminali mesenchimali meglio caratterizzate risultano essere quelle umane mentre sono meno conosciuti gli antigeni di superficie delle MSC di topo e di ratto.

In particolare le MSC murine sono negative per gli antigeni di superficie CD34, CD44, CD45, c-kit e MHC I e II, mentre esprimono bassi livelli di Flk-1, Sca-1 e Thy-1 e alti livelli di CD13. Risultati simili sono stati ottenuti isolando MSC da ratti.



a)



b)

Fig. 2.1: a) H9c2; b) MSCs di ratto.

2.2 Biopolimeri utilizzati

I biopolimeri impiegati in questa ricerca sono stati: acido poli-L-lattico e estere poli(ω -pentadecalattone) preparati mediante un originale metodo di elettrofilatura messa a punto dal gruppo di “Scienza dei Polimeri” del Dipartimento di Chimica “G. Ciamician” dell’Università di Bologna ed HYAFF-11[®] rete, un estere dell’acido ialuronico fornito da Fidia Advanced Biopolymers, FAB, Abano Terme, Italia.

Elettrofilatura

L'elettrofilatura (detta anche filatura elettrostatica o electrospinning) è un processo produttivo che consente, nell'industria dei polimeri, di ottenere filamenti continui di materiale sintetico di diametro nanometrico [60]. Con i metodi di filatura convenzionali è possibile produrre filamenti con diametri minimi dell'ordine di qualche micron, mentre per produrre filamenti continui con diametro inferiore occorre utilizzare metodi di produzione diversi, in cui il filamento in formazione possa essere stirato con forze di elongazione più omogenee e costanti possibili, per evitarne la rottura. La tecnica più promettente in questo senso risulta appunto l'elettrofilatura [61], in cui un getto polimerico viene stirato all'interno di un elevato campo elettrico. I filamenti così prodotti raggiungono finezze dell'ordine di 100 nm. Un impianto di elettrofilatura consiste principalmente in un estrusore che spinge il polimero fuso o in soluzione all'interno di un capillare ed uno schermo di raccolta posto di fronte al capillare. Il capillare e lo schermo collettore sono caricati elettrostaticamente ad un diverso potenziale elettrico. L'elevata finezza delle fibre elettrofilate consente di produrre materiali con un altissimo rapporto superficie/volume e una elevata porosità.

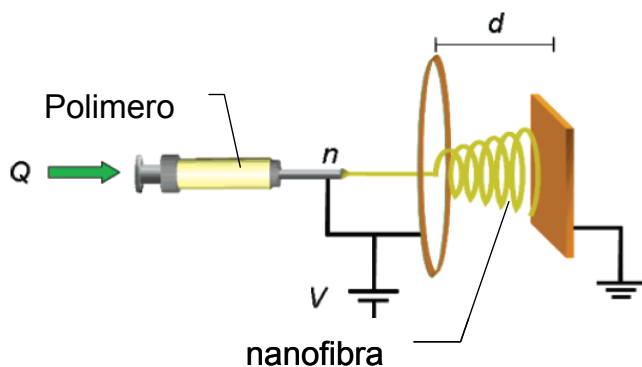


Fig. 2.2: Elettrofilatura (schema).

La tecnologia sviluppata consente di raccogliere le nanofibre secondo un ordine ed una disposizione spaziale (architettura dello scaffold) che permette alle cellule di crescere sia superficialmente che nello spessore dando così vita ad un neo-tessuto (tessuto cellulare non vascolarizzato) [62] [63].

2.2.1 Acido poli-L-lattico

L'acido poli-L-lattico o poli-L-lattide è un poliestere alifatico biodegradabile e termoplastico derivato da risorse rinnovabili [64] [65].

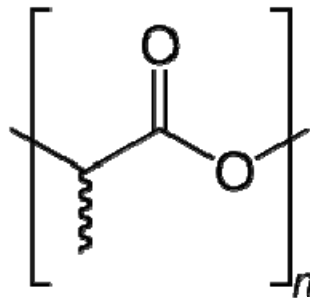


Fig 2.3: Formula di struttura dell'acido polilattico.

Il PLA è ricavabile da amido di mais (negli USA) e dalle canne da zucchero (nel resto del mondo) tramite fermentazione batterica che produce acido lattico, il quale viene oligomerizzato (un oligomero consiste in un numero finito di unità monomeriche, in contrapposizione a polimero che è formato, in teoria, da un numero infinito di monomeri), e successivamente viene dimerizzato tramite catalizzatore (cloruro stannoso SnCl_2) per formare il monomero e rendere possibile la polimerizzazione tramite apertura d'anello, attraverso tali processi è possibile ottenere un polimero ad alto peso molecolare. Dato il procedimento di formazione il PLA ed i suoi derivati si presentano come valide alternative ai prodotti ottenuti dalla lavorazione petrolchimica.

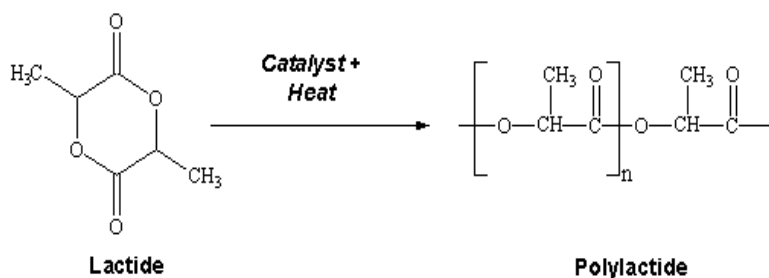


Fig 2.4: Polimerizzazione per apertura d'anello da lattide a polilattide.

Data la chiralità dell'acido lattico ci sono diverse forme di polilattide. Il PLLA è ottenuto dalla polimerizzazione di L-lattide, ha una cristallinità del 37%, una temperatura di transizione vetrosa compresa fra i 50 °C ed gli 80 °C ed una temperatura di rammollimento di 173 °C – 178 °C; quando il PLLA è ottenuto dalla polimerizzazione del monomero ciclico il lattide agisce da plastificante, migliorando la lavorabilità, la flessibilità e la duttilità del polimero, ed abbassando la temperatura di transizione vetrosa fino a 30 °C - 35 °C rendendolo utilizzabile per studi fisiologici.

L'acido polilattico può essere lavorato in fibre ed in film, aumentandone così la temperatura di rammollimento. A causa dell'alta cristallinità di tale polimero la biodegradazione avviene più lentamente.

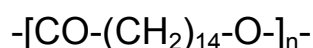
Una caratteristica interessante del PLLA è che, anche una volta lavorato, rimane trasparente, consentendo così un'analisi al microscopio delle cellule che vi vengono coltivate.

Il PLA ed i suoi derivati sono attualmente utilizzati in numerose applicazioni biomedicali, fra cui fili da sutura, fabbricazione di stents e di dispositivi per la dialisi ed anche come materiale di supporto per l'ingegneria tissutale.

2.2.2 Estere poli(ω -pentadecalattone)

Il poli(ω -pentadecalattone) (PPDL) è un poliestere alifatico sintetizzato mediante biocatalisi al Politecnico di Brooklyn (NY, USA), presso il "Center for Biocatalysis and Bioprocessing of Macromolecules" della National Science Foundation (NSF-CBBM). caratterizzato da un'elevata idrofobicità.

Il PPDL è un poliestere non commerciale la cui unità ripetitiva è:



La sintesi del PPDL avviene per apertura dell'anello a 16 membri dell' ω -pentadecalattone, utilizzando l'enzima lipasi B da *Candida antarctica* immobilizzata su resine (Novozyme-435). La reazione viene condotta a 70 °C in toluene, e terminata con l'aggiunta di un eccesso di cloroformio freddo e la rimozione dell'enzima (solido) mediante filtrazione. La porzione insolubile viene lavata diverse volte con cloroformio caldo e i filtrati vengono riuniti in un'unica

soluzione. Il solvente (cloroformio) viene in parte eliminato mediante evaporazione ottenendo una soluzione polimerica concentrata. Il polimero viene poi precipitato in metanolo.

La biocatalisi permette di sintetizzare polimeri con strutture macromolecolari complesse e pesi molecolari elevati, in assenza di metalli pesanti e di altri catalizzatori non desiderati ed in condizioni di reazione particolarmente blande. Tra i vari polimeri sintetizzati, il poliestere PPDL ottenuto con alto peso molecolare per reazione di apertura di anello mediante l'uso di enzimi (lipasi) immobilizzati su resine, è un polimero interessante perché contiene gruppi esterei intervallati da lunghe sequenze metileniche e si colloca, dal punto di vista della sua struttura, tra due polimeri ampiamente utilizzati: il policaprolattone e il polietilene.

Il PPDL, del quale sono state studiate le proprietà fisiche, è un poliestere cristallino con ottima stabilità termica e buone proprietà meccaniche.

2.2.3 Acido ialuronico esterificato: HYAFF-11[®]

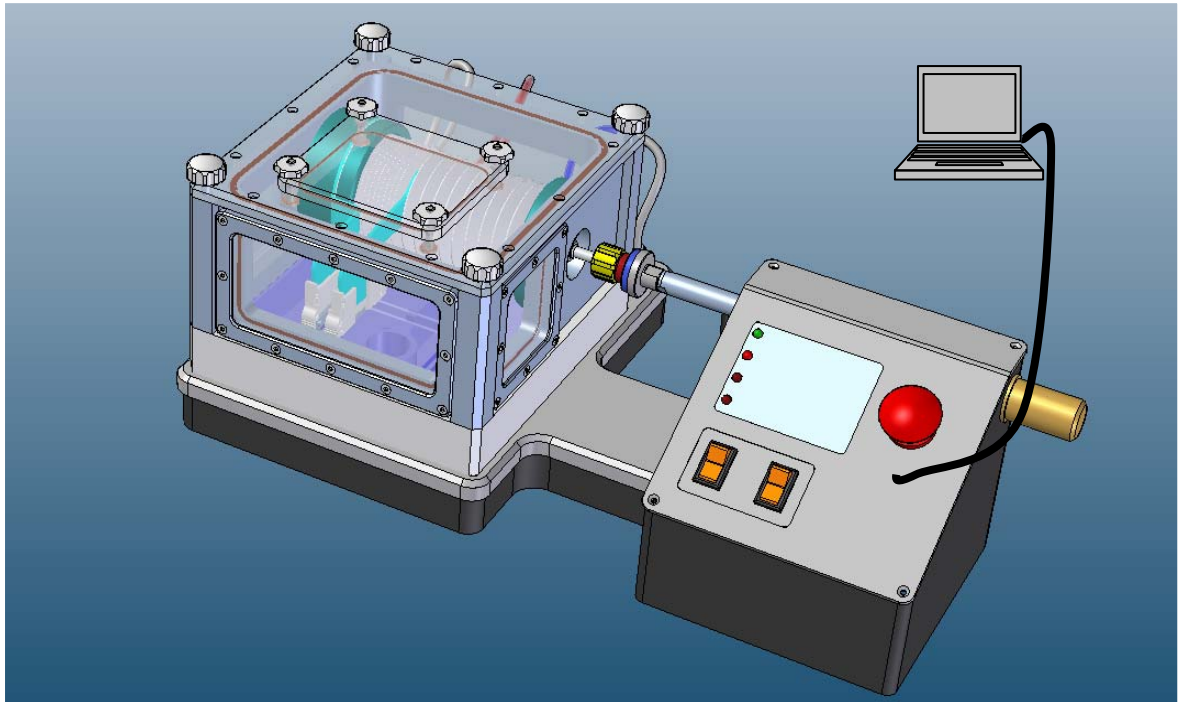
L'acido ialuronico è uno dei componenti fondamentali dei tessuti connettivi dell'uomo e degli altri mammiferi ed è uno dei principali componenti polisaccaridici della matrice extracellulare presente inoltre abbondantemente nei tessuti mesenchimali dell'embrione. Chimicamente è definibile come un glicosaminoglicano dalla catena polisaccaridica non ramificata prodotta dall'aggregazione di migliaia di unità disaccaridi che, formate a loro volta da residui di acido glucuronico, un derivato del glucosio e N-acetilglucosammina. *In vivo* tutti i gruppi carbossilici dell'acido glucuronico e della N-acetilglucosammina sono completamente ionizzati conferendo alla molecola di acido ialuronico elevata polarità, e di conseguenza una elevata solubilità in acqua. Grazie a questa sua proprietà l'acido ialuronico è in grado di complessarsi con moltissime molecole di acqua raggiungendo un elevato grado di idratazione. La maggior parte delle cellule del corpo hanno la capacità di sintetizzare acido ialuronico durante qualche fase del loro ciclo vitale, e questo implica una sua funzione in diversi processi biologici fondamentali. Tuttavia, essendo un polimero lineare estremamente idrofilo, l'acido ialuronico naturale si presenta come un gel viscoso e non ha, pertanto, le caratteristiche strutturali per poter essere utilizzato di per sé come dispositivo medico chirurgico. Grazie all'impiego di una tecnologia

che ha modificato le caratteristiche chimico-fisiche dell'acido ialuronico, conservando intatte le sue naturali proprietà biologiche, esso è stato trasformato in un biopolimero denominato HYAFF-11[®] da Fidia Advanced Biopolymers, *FAB*, Abano Terme, Italia.

Lo HYAFF-11[®] è un estere dell'acido ialuronico, ottenuto mediante un processo di esterificazione con alcol benzilico del gruppo carbossilico dell'acido glucuronico. Il processo di esterificazione riduce l'idrofilicità della molecola e rende l'acido ialuronico meno solubile in acqua [66] [67]. In questo studio HYAFF-11[®] è stato utilizzato in forma di rete per realizzare uno scaffold caratterizzato da fibre micrometriche tessute a trama, con proprietà elastiche opportune per sostenere uno stiramento meccanico ciclico in bioreattore.

2.3 Bioreattore per coltura cellulare dinamica

Il bioreattore utilizzato (fig. 2.5) è stato progettato e costruito grazie ad una collaborazione con i dipartimenti DIEM e DEIS dell'Università di Bologna.



a)



b)

Fig. 2.5: a) Progetto; b) Prototipo realizzato

La strumentazione che costituisce il sistema nel suo complesso è raffigurata in fig. 2.6 e composta da:

1. Camera di coltura e azionamento mediante motore lineare (LinMot P01-23Sx80, Svizzera).
2. pH-metro (Jenway 3310, Regno Unito).
3. CO₂ controller (Harward Apparatus 702116, Stati Uniti).
4. Case contenente alimentazioni, controllore del motore e terminaliera.
5. Computer portatile (Dell-Latitude D620) dotato di scheda di acquisizione e controllo (DAQCard-6062E NI, Stati Uniti).

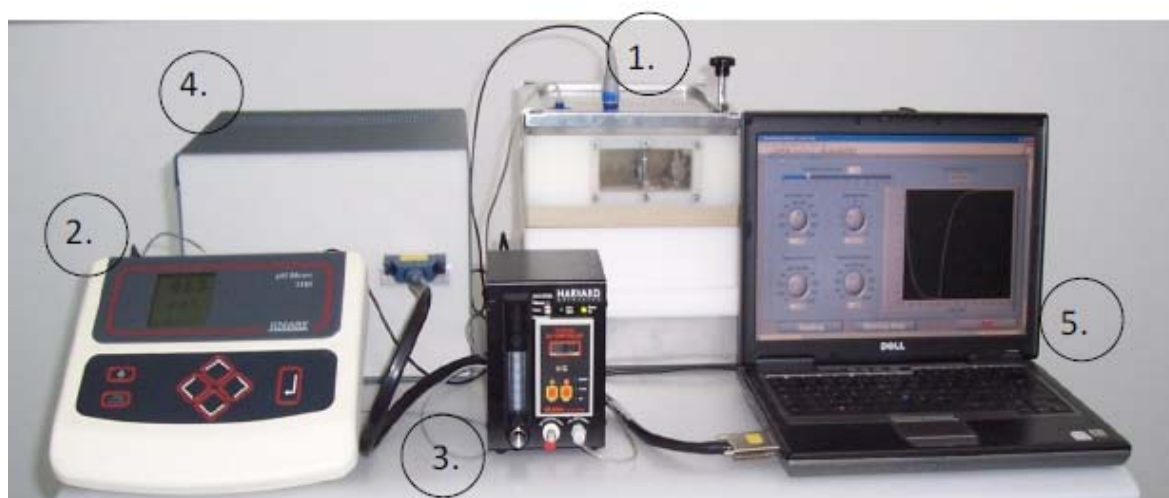


Fig. 2.6: Strumentazione impiegata.

2.3.1 Camera di coltura

La camera di coltura (fig. 2.7) deve essere considerata come un incubatore vero e proprio in cui le cellule vengono mantenute ad una temperatura di 37 °C in una atmosfera umidificata con il 5% di CO₂, ed il suo compito è quello di consentire lo sviluppo delle cellule primarie e di favorire la loro differenziazione attraverso una sollecitazione meccanica impressa dal motore esterno.

La camera di coltura è così composta:

1. Braccio meccanico che permette il movimento dell'afferraggio mobile.
2. Foro per l'inserimento della sonda di pH.
3. Sensore di temperatura.
4. Afferraggio fisso con estensimetri.
5. Afferraggio mobile.

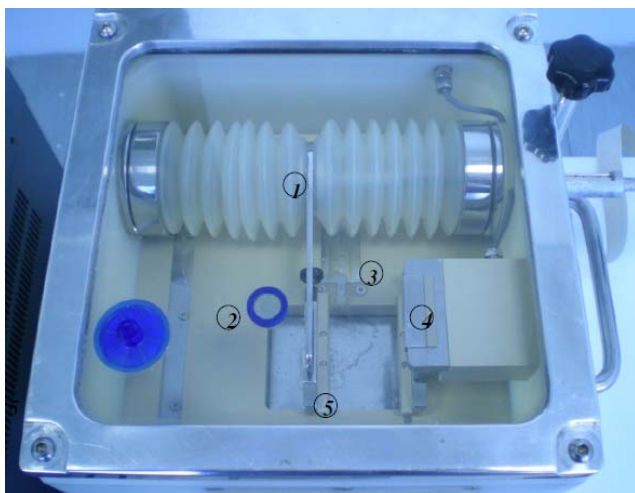


Fig. 2.7: Camera di coltura.

La camera di coltura è costituita da una piccola vasca con due afferraggi fissati ad un braccio fisso e uno mobile, i quali consentono di movimentare uno scaffold (costituito da un sottile tessuto elastico) sul quale vengono depositate le cellule di interesse. Gli afferraggi sono costituiti da due parti assemblabili, una in acciaio inox e una in Tecapeek, fra le quali, come mostrato nelle immagini successive, viene fissato lo scaffold.

Inizialmente, le porzioni in acciaio inox degli afferraggi vengono poste su un supporto di Tecaflon PVDF precedentemente autoclavato (fig. 2.8)

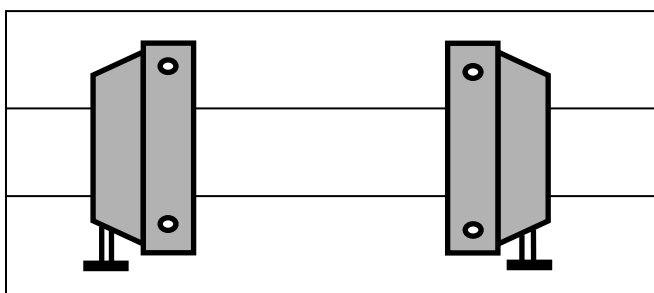


Fig. 2.8: Porzioni metalliche degli afferraggi poste su supporto in Tecaflon PVDF (schema)

Successivamente, lo scaffold con le cellule a bordo, raffigurato nella figura 2.9 con una trama rosacea, viene posto sulle porzione metalliche degli afferraggi, ed infine fissato, mediante l'utilizzo di viti sterili, alle porzioni in Tecapeek su ognuna delle quali è saldata una barra metallica con funzione di mantenere lo scaffold in trazione (fig. 2.10 e 2.11).

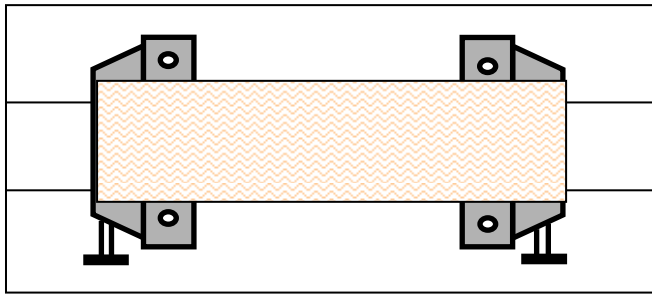


Fig. 2.9: Scaffold posto sulle porzioni metalliche degli afferraggi (schema).

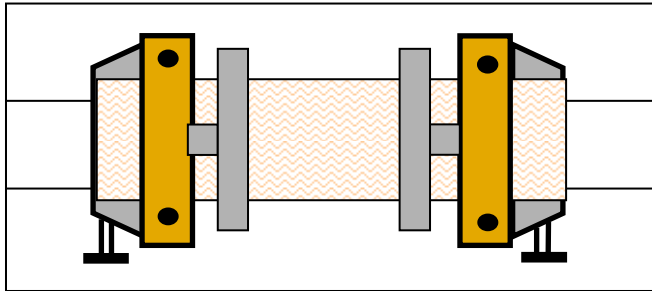


Fig. 2.10: Fissaggio dello scaffold (schema).

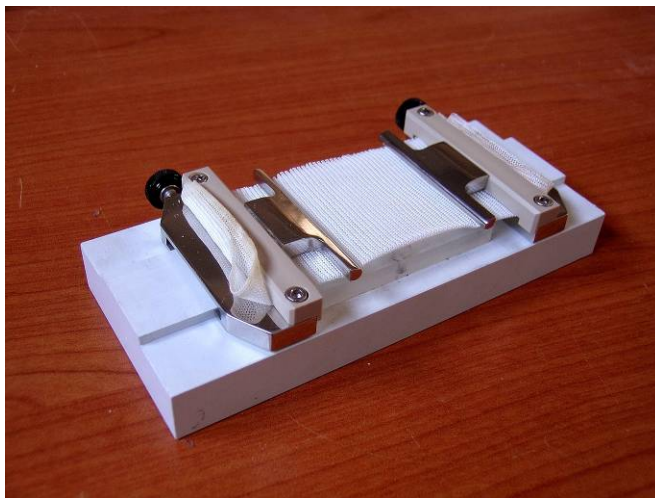


Fig. 2.11: Fissaggio dello scaffold.

A questo punto gli afferraggi vengono fissati ai bracci presenti nella camera di coltura del bioreattore e le cellule a bordo dello scaffold vengono stimulate dinamicamente dal movimento che viene impresso al morsetto mobile, a sua volta sollecitato da un motore meccanico localizzato all'esterno della camera. Prima di iniziare la sollecitazione meccanica, lo scaffold viene pretensionato in maniera tale sia sufficientemente teso (fig. 2.12).

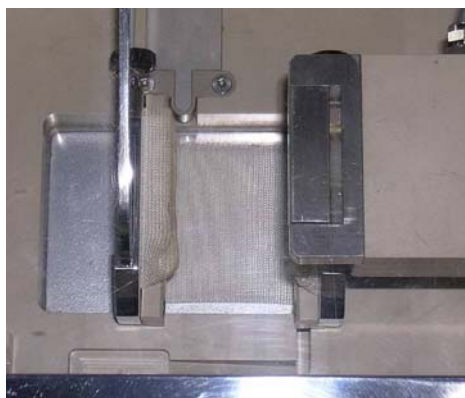


Fig. 2.12: Scaffold posto in tensione tra gli afferraggi.

Solo a questo punto ha inizio la sollecitazione meccanica che consiste in un rilassamento periodico con ritorno nella condizione di partenza..

La camera è isolata dall'ambiente esterno per evitare la contaminazione della coltura cellulari da parte di batteri o altri microrganismi. Tutte le manipolazioni (apertura della camera, sostituzione del terreno, prelievo dei campioni) vengono fatte in cappe a flusso laminare provviste di filtri, che limitano la contaminazione da microrganismi. Prima di inserire lo scaffold contenente le cellule all'interno della camera di coltura è inoltre necessario sterilizzare la camera (vedi pag. 67). Condizione necessaria per la vitalità delle cellule in coltura è che la temperatura e il pH siano mantenuti a livelli fisiologici, ossia rispettivamente pari a 37 °C e 7.4 pH. All'interno della camera di coltura sono presenti un sensore di temperatura, un sensore di forza ed un sensore di pH.

Sensore di temperatura

Il sensore di temperatura utilizzato (fig. 2.13) è un termistore PTC (*Positive Temperature Coefficient*). Le misure di temperatura tramite termistori sfruttano la loro variazione di resistenza al variare della temperatura.

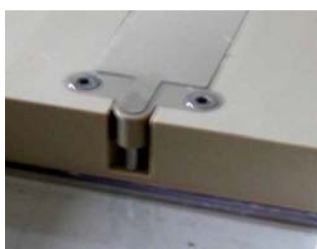


Fig. 2.13: Sensore di temperatura.

Sensore di forza

La sollecitazione meccanica alla quale è sottoposto lo scaffold viene rilevata da un sensore di forza, posto sull'afferraggio fisso (fig. 2.14). Il sensore di forza utilizzato è ad estensimetro. Gli estensimetri misurano la deformazione per determinare la forza (carico) applicata. La deformazione è uno stato di tensione in cui la forma di un materiale tende a cambiare. Nello specifico, la deformazione riguarda la modifica della lunghezza, dL , divisa per la lunghezza originale, L , la cui variazione è direttamente proporzionale al carico applicato (fig. 2.15). Grazie al rilevamento della deformazione e conoscendo le caratteristiche fisiche della struttura a cui il carico è applicato, è possibile calcolare la forza in maniera accurata.

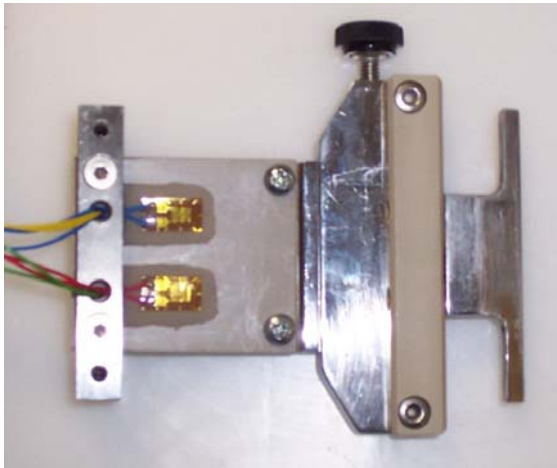


Fig. 2.14: Estensimetri applicati al braccio fisso.

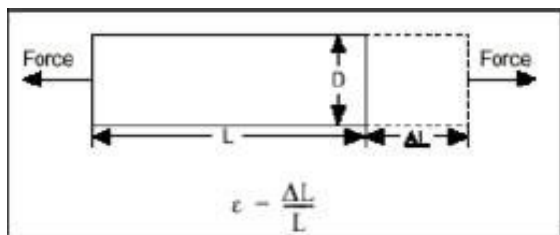


Fig. 2.15: Deformazione di un oggetto sollecitato da uno sforzo normale.

Sensore di pH

La misurazione del pH avviene utilizzando una sonda Slimtrode della Hamilton che attraverso un foro presente sul lato superiore della camera di coltura arriva nella vaschetta contenente il terreno di coltura. La sonda è collegata ad un pH-metro posizionato esternamente.

2.3.2 pH-metro

Il pH-metro usato nel bioreattore è il Jenway 3310 un dispositivo per la misurazione potenziometrica del pH.

Le caratteristiche dello strumento sono riportate di seguito:

pH

Range: -2 - 16 pH

Risoluzione: 0.01 pH

Precisione: ± 0.02 pH

mV (Assoluti o Relativi)

Range: -1999 - +1999mV

Risoluzione: 1mV

Precisione: ± 1 mV

Temperatura

Range: -10 - +105 °C

Risoluzione: 0.1 °C

Precisione: ± 0.5 °C

Range Compensazione Automatica della Temperatura(ATC): 0 to 100 °C

Calibrazione: a 1 o 2 punti

Outputs: Analogico 1mV per digit, RS232 bidirezionale

Display: LCD

Alimentazione: 9Vac

2.3.3 Controllore della CO₂

Il compito di questo strumento è quello di correggere il valore di pH del terreno di coltura quando questo eccede di un valore predeterminato. Ciò avviene ad opera di un flusso di CO₂, contenuto in una bombola collegata allo strumento, che viene liberato nell'ambiente di coltura. Per correggere il valore del pH è necessario impostare il valore del pH desiderato in maniera tale che esso funga da valore di riferimento ogni qual volta viene effettuata la misurazione del pH in soluzione. Se il valore del pH misurato supera il valore impostato, viene aperta per un tempo prefissato la valvola che consente il flusso di CO₂ nell'incubatore.

Il controllore di CO₂ è stato modificato in maniera tale da poter impostare a priori la durata del flusso di CO₂. Questo perché il pH non viene ripristinato

istantaneamente, ma solo dopo un certo intervallo di tempo nel quale il controllore continuerebbe a rilasciare CO_2 nel sistema. In questo modo il pH della soluzione calerebbe in modo eccessivo. La correzione del pH avviene ad opera della CO_2 in quanto questo gas viene scambiato con il sistema tampone (bicarbonato) della soluzione di coltura. Nel terreno di coltura le attività metaboliche delle cellule causano una riduzione del valore del pH

Il controllore della CO_2 usato nel bioreattore è l'Harvard Apparatus 702116 (fig. 2.16).



Fig. 2.16: Harvard Apparatus 702116.

2.3.4 Case

Il case è il contenitore in cui sono collocate le alimentazioni dei circuiti di rivelazione di forza e temperatura, il controllore del motore e la terminaliera (fig. 2.17).



Fig. 2.17: Alimentazioni dei sensori di forza e temperatura.

La sollecitazione meccanica viene impressa da un motore lineare (LinMotP01-23Sx80); Il motore è pilotato da un controllore (LinMot E100-AT), gestito dal computer attraverso un apposito programma, ed è dotato di una propria alimentazione (LinMot S01-24/150) entrambi collocati nel case.

Il motore LinMot PS01-23Sx80 (fig. 2.18 e 2.19) è un motore lineare brushless. La forza elettromagnetica fornisce un movimento lineare diretto senza l'utilizzo di ingranaggi, cinghie o altro dispositivo meccanico. Il motore consiste di solo due parti: lo slider e lo statore. Lo slider è una costruzione di precisione realizzata con un tubo di acciaio inox, riempito con magneti di neodimio, provvisto di fori filettati per il montaggio ad ogni estremità. Lo statore include le bobine, le boccole di scorrimento per lo slider, i sensori di posizione e il microprocessore.



Fig. 2.18: Motore LinMot PS01-23Sx80.

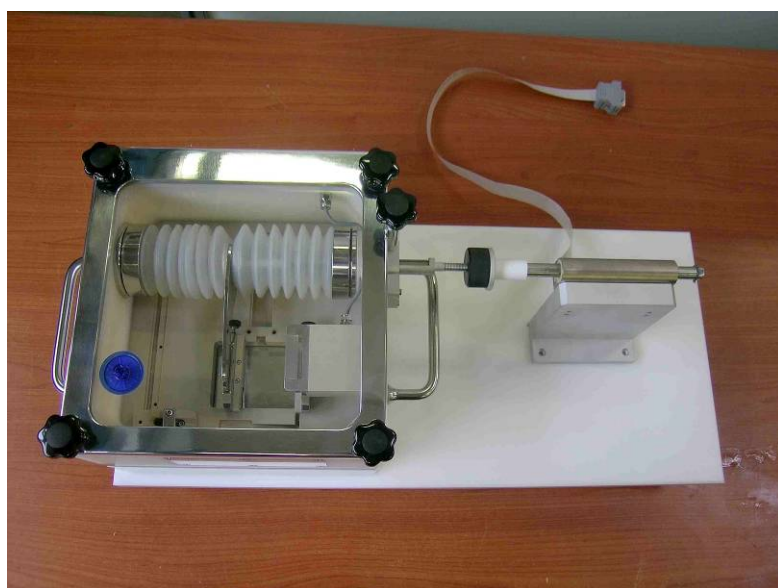


Fig. 2.19: Camera di coltura e motore lineare.

Infine, la terminaliera (CB-68LPR I/O, Stati Uniti) (fig. 2.20), sempre locata nel case, consente di accedere agevolmente agli input e agli output della scheda di acquisizione NI DAQ-card 6062E necessaria per acquisire i segnali e per controllare il motore lineare.



Fig. 2.20: Terminaliera.

2.3.5 Computer e scheda di acquisizione

Il computer che fa parte del sistema bioreattore ha a bordo una scheda di acquisizione NI DAQ-card 6062E. Connessa alla terminaliera CB-68LPR I/O ha la capacità sia di acquisire in ingresso dei dati analogici e digitali, che di generare degli output analogici e digitali (fig. 2.21).



Fig. 2.21: Connessione della scheda di acquisizione con un computer: 1. Computer portatile; 2. DAQ Card-6062E; 3. Cavo di connessione SHC68-68-EP; 4. Terminaliera di Input/Output.

Il software dedicato (sviluppato in ambiente Labview) consente di gestire l'intero bioreattore.

2.3.6 Software di gestione del bioreattore

Dopo che lo scaffold è stato inserito tra gli afferraggi, nella fase iniziale di funzionamento del bioreattore, il software provvede alla misura della tensione generata dagli estensimetri con lo scaffold in condizione di riposo. Questo valore di tensione è l'offset del sensore di forza e viene sottratto nella fase di messa in scala della forza generata dagli estensimetri.

Sul pannello di lavoro è stato posizionato un led che si illumina per segnalare che il software sta calcolando l'offset; solo quando l'offset è stato misurato il led si spegne e l'operatore può lanciare il comando di pretensionamento e quindi di pulsazione.

Le prove condotte con il bioreattore hanno una durata di diversi giorni, per cui il numero di cicli a cui è sottoposto lo scaffold è elevato.

Lo scaffold, a causa delle proprietà del polimero che lo costituisce, dopo un certo numero di sollecitazioni, tende a rilassarsi e quindi a perdere di tensione. A causa del rilassamento dello scaffold le cellule non vengono più sollecitate opportunamente, così come previsto dall'operatore nella fase iniziale della prova. Da questa problematica è nata la necessità di un controllo in retroazione della forza imposta dal motore, in maniera tale da compensare le perdite di tensione dovute al rilassamento dello scaffold. Questo controllo è reso possibile dal sensore di forza ad estensimetri che rileva in continuo l'entità della sollecitazione che agisce sullo scaffold. Il principio sul quale verte la retroazione è basato sul confronto tra il valore della forza massima di ciascun buffer con il valore di prepensionamento iniziale, ed eventualmente, se tali valori si discostano di una quantità prefissata, sulla compensazione con un aumento del pretensionamento in millimetri, fino a rientrare nel range della forza di pretensionamento iniziale impostato.

Nel software, tale controllo è stato realizzato attraverso quattro passaggi successivi, ossia salvataggio del valore iniziale di pretensionamento in Newton, filtraggio della forma d'onda generata dagli estensimetri, estrazione dei parametri significativi dal buffer di forme d'onda generato dagli estensimetri, cioè valore di fine sistole e valore di fine diastole in Newton di ciascun buffer, confronto tra il valore del pretensionamento iniziale e il valore di fine sistole entrambi in Newton ed eventuale compensazione.

La schermata di lavoro è costituita da tre pannelli. Il primo pannello, Motion Profile, visualizzato in figura 2.22, consente di impostare i parametri della forma d'onda che genera un singolo battito; la forma d'onda viene visualizzata in uscita. Attraverso la barra di pretensionamento l'operatore decide di imporre attraverso il movimento del motore lo spostamento opportuno (Pretension Offset) che garantisce di avere lo scaffold adeguatamente teso. In base all'entità dello spostamento imposto dal motore gli estensimetri generano un segnale in tensione che viene convertito in Newton e visualizzato sul pannello (Pretension Force). Nel primo pannello è inoltre visualizzato il led che segnala la calibrazione degli estensimetri.

Il secondo pannello (Monitor) (fig. 2.23) consente di visualizzare tutti i segnali acquisiti. Nel grafico in alto a sinistra, "Stretch (mm)", viene visualizzato il buffer di forma d'onda cardiache imposto dal motore.

Nel grafico in basso a sinistra, "Strain (N)", viene visualizzato il buffer di forme d'onda generato dagli estensimetri in seguito alla sollecitazione imposta dal motore. Nel grafico in alto a destra, "Initial Strain - End Systolic - End Diastolic (N)", viene visualizzato l'andamento della forza di fine sistole (End Systolic) e quello della forza di fine diastole (End Diastolic). Viene inoltre riportato il valore costante del pretensionamento iniziale (Initial strain) e l'intorno di errore che si ammette di avere nella fase di controllo. In questo modo è immediato osservare se il valore della forza di fine sistole si trova all'interno della fascia consentita e quindi se il controllo in retroazione sta agendo in maniera efficace.

Il grafico in basso a destra, "Temperature (°C) - pH", porta in uscita l'andamento dei segnali di temperatura e pH nel tempo.

Sono inoltre visualizzati i valori numerici correnti dei segnali di: massima posizione raggiunta dal motore nella fase di sollecitazione (Max Displacement (mm)), pretensionamento iniziale costante (Initial Strain (N)), forza di fine sistole e forza di fine diastole, rispettivamente End Systolic (N) e End Diastolic (N), temperatura (Temperature (°C)), pH e il tempo trascorso dall'inizio della prova (Time After Start (HH:MM:SS)).

Nell'ultimo pannello (Fig. 2.24), "Configuration", vengono impostati i parametri del motore, viene visualizzato il profilo di tensione imposto dal motore, vengono impostati i parametri relativi al controllo in retroazione del segnale di forza e viene selezionato il file di salvataggio dei dati.

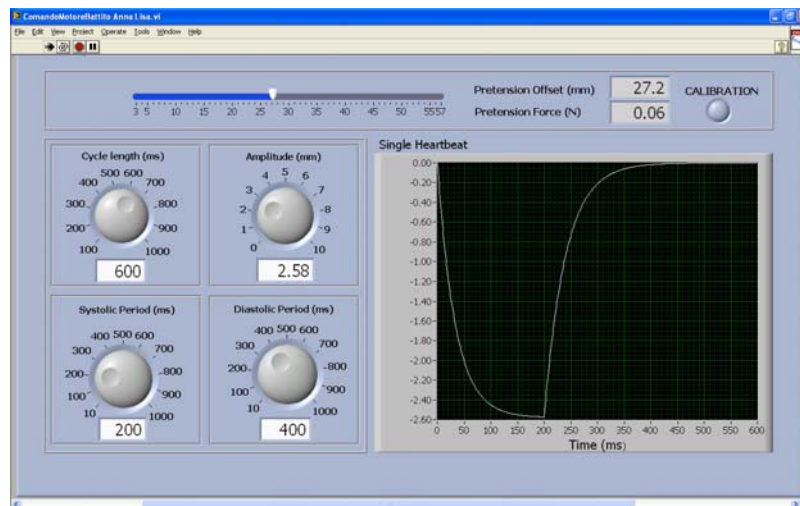


Fig. 2.22: Pannello Motion Profile.

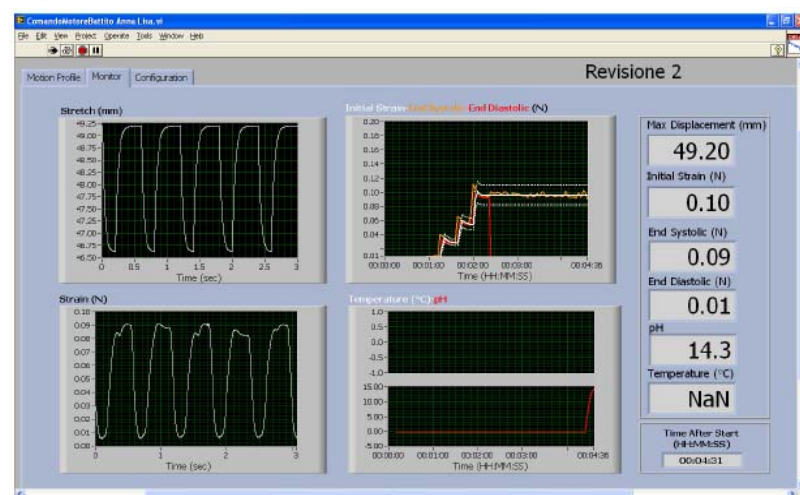


Fig. 2.23: Pannello Monitor.

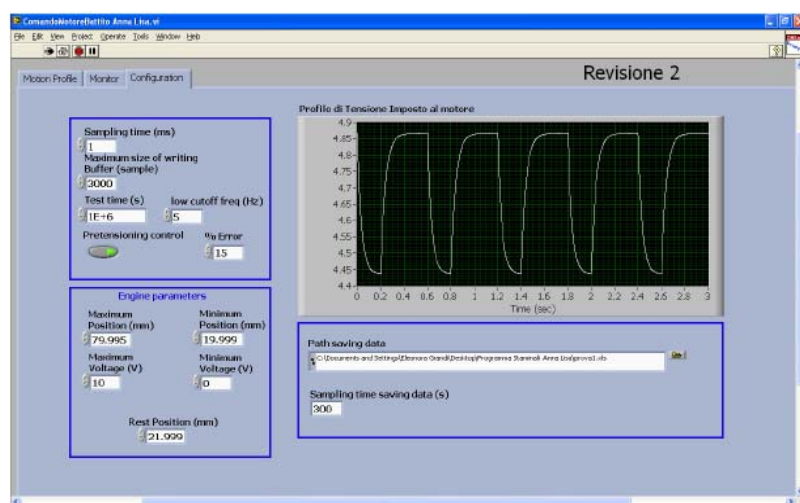


Fig. 2.24: Pannello Configuration.

2.4 Metodiche impiegate

2.4.1 Isolamento e coltura di MSCs di ratto

Queste cellule sono state isolate attraverso un lavaggio del canale midollare di femore di ratti Sprague-Dawley (Charles River Laboratories) di circa 3-4 mesi di età.

Utilizzando una siringa con ago di 21 è stato eseguito un lavaggio del canale femorale con 40 mL di α -Modified Eagle's Medium addizionato con penicillina/streptomicina 100 U/mL, L-glutamina 0.1 μ g/mL, fungizone 250 μ g/mL e siero bovino fetale (FBS) al 20%.

La sospensione cellulare ottenuta è stata filtrata su filtro di nylon del diametro di 70 μ m e seminata in fiasche da 75 cm². Le cellule sono state poi poste in incubatore a 37 °C in presenza di CO₂ al 5% per 28-48 ore. Si è quindi proceduto all'eliminazione delle cellule non aderenti effettuando 2 lavaggi con tampone salino fosfato (PBS) e aggiungendo terreno completo con FBS al 10%. Le cellule aderenti sono poi state mantenute in coltura per circa 10 giorni fino alla formazione di un monostarto cellulare sostituendo il terreno di coltura ogni 3-4 giorni.

2.4.2 Sterilizzazione degli scaffold elettrofilati

La semina di cellule avvenuta sugli scaffold ottenuti mediante elettrofilatura, è stata preceduta dalla sterilizzazione delle matrici polimeriche eseguita seguendo il protocollo qui descritto:

1. Due lavaggi di 15 minuti ciascuno in etanolo 70%.
2. Ripetuti lavaggi in tampone fosfato salino (PBS) addizionato di antibiotici penicillina/streptomicina 100U/mL e fungizone 0.2%.
3. Lavaggi in PBS standard.

2.4.3 Test di vitalità e crescita cellulare: the Alamar Blue[®] assay

Prove di vitalità e crescita cellulare sono state eseguite utilizzando Alamar Blue[®] (Invitrogen) un colorante vitale non tossico a base di Resazurina (fig. 2.25) che permette di analizzare ripetutamente una stessa popolazione cellulare proliferante [68].

Il metodo si basa sulla valutazione del rapporto tra NADPH/NADP, FADH/FAD, FMNH/FMN e NADH/NAD, che aumenta durante la proliferazione cellulare. L'Alamar Blue® viene ridotto da questi intermedi del metabolismo e a questo processo si accompagna una variazione della fluorescenza emessa (Ex/Em = 540/590 nm) che può essere quantificata al fluorimetro, oltre ad una variazione colorimetrica passando dal blu (forma ossidata) al rosa (forma ridotta). Per quanto concerne la metodica: Alamar Blue® è stato utilizzato alla concentrazione di 10% in apposito terreno di coltura e lasciato a contatto con le cellule per 4 ore in incubatore a 37 °C; al termine di questo periodo d'incubazione il medium contenente il colorante è stato trasferito in apposito fluorimetro mentre alla coltura cellulare, dopo alcuni lavaggi con tampone fosfato PBS, è stato aggiunto terreno fresco.

Il test è stato eseguito 24 ore dopo la semina e ripetuto a giorni alterni.

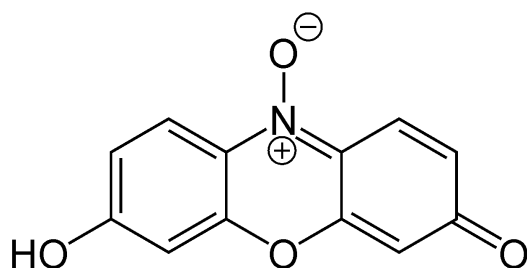


Fig. 2.25: Struttura della Resazurina.

2.4.4 Test di vitalità e crescita cellulare: the MTT assay

Un altro test che permette di valutare la proliferazione cellulare è quello che prevede l'utilizzo di un sale giallo di tetrazolio, MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5- difenil tetrazolio bromuro) (Sigma Aldrich) [69], che viene trasformato in cristalli di formazano, viola (fig. 2.26), dalle cellule metabolicamente attive, poiché la reazione coinvolge i cofattori NADH e NADPH. I cristalli di formazano vengono poi solubilizzati ottenendo una soluzione colorata di cui è possibile misurare l'assorbanza. I valori di assorbanza dei vari campioni vengono poi interpolati su una retta di taratura, precedentemente preparata, seminando quantità note di cellule, per correlare il numero di cellule vive con i valori di assorbanza.

Per quanto concerne il protocollo di utilizzo, le cellule sono state tripsinizzate utilizzando una soluzione di tripsina 200 mg/L e EDTA 200 mg/L per 3 min a 37 °C dopo un lavaggio in PBS, contate in camera di Burker e seminate in multiwell da 96 pozzetti. Ogni punto è stato seminato in quadruplo, inoculando 1500 cellule/pozzetto in 100 µL di terreno completo. La valutazione della proliferazione è stata eseguita ogni due giorni aggiungendo 10 µL di MTT (5mg/mL in PBS) ad ogni pozzetto. Dopo due ore di incubazione i cristalli di formazano sono stati solubilizzati mediante l'aggiunta di una soluzione di solubilizzazione contenente 10% di SDS in HCl 0.01 M e la lettura dell'assorbanza a 595 nm è stata eseguita il mattino seguente

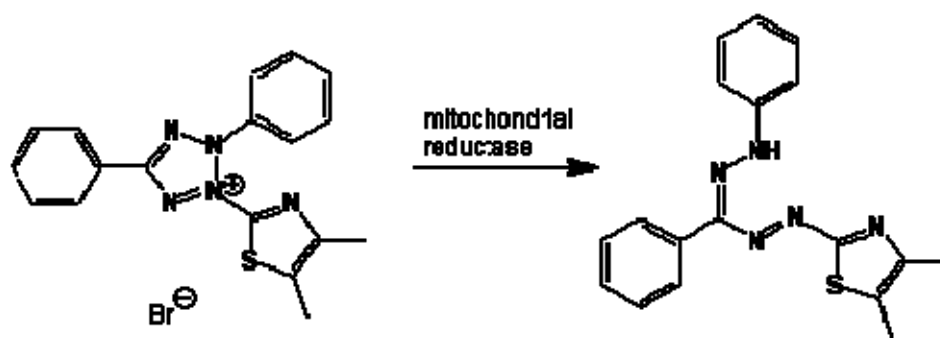


Fig. 2.26: Riduzione enzimatica del sale di tetrazolio (giallo) a formazano (viola).

2.4.5 Test di vitalità cellulare: the CFDA SE assay

Tale test di vitalità cellulare prevede l'impiego del fluorocromo vitale carbossi-fluoresceina-diacetato succinimidil estere (CFDA SE, Invitrogen) (fig. 2.27) [70].

CFDA SE diffonde passivamente attraverso le membrane cellulari e rimane incolore e non fluorescente finchè i suoi gruppi acetati non vengono tagliati dalle esterasi intracellulari; a questo punto il gruppo succinamidil estere è in grado di reagire con le amine intracellulari dando origine a coniugati fluorescenti (Ex/Em = 492/517 nm).

Il protocollo impiegato è stato il seguente: il CFDA SE è stato utilizzato alla concentrazione di 10 µM in tampone fosfato salino (PBS); la soluzione così ottenuta è stata sostituita al terreno di coltura e con essa le cellule sono state incubate a 37 °C per 15 minuti.

In seguito, tale soluzione è stata sostituita con medium fresco e le cellule incubate per altri 30 minuti, passaggio necessario affinché avvenisse l'idrolisi dei gruppi acetati con successiva formazione di coniugati fluorescenti.

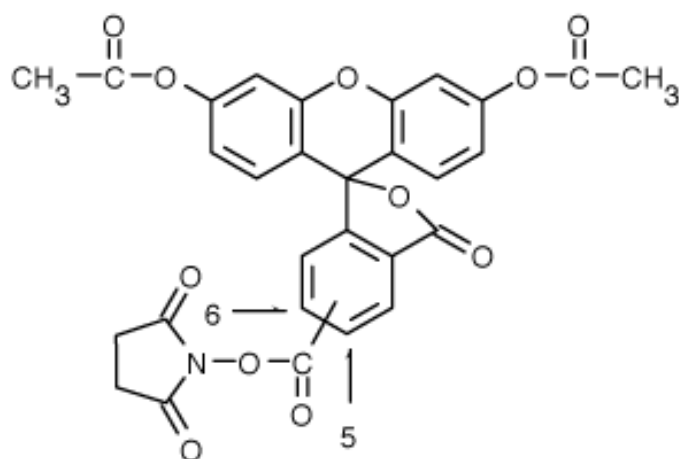


Fig. 2.27: Struttura di CFDA SE.

2.4.6 Test di citotossicità indiretta: the sulforhodamine B (SRB) assay

La sulforodamina B o SRB (fig. 2.28) (Sigma-Aldrich) è una molecola fluorescente (Ex/Em=565/586 nm) che viene largamente utilizzata per valutare la citotossicità indiretta *in vitro* [71].

La SRB è un aminoxantene colorato (rosa brillante) in grado di legare i componenti proteici di cellule precedentemente fissate alle piastre di coltura con acido tricloroacetico (TCA); essa, infatti, possiede due gruppi solfonici che in ambiente acido si legano stechiometricamente ai residui amminocidici delle proteine permettendo quindi di valutare la densità della popolazione cellulare.

Il protocollo impiegato si propone come tecnica alternativa alla conta con emocitometro, con una maggiore semplicità di utilizzo, e fa riferimento all'utilizzo di una coltura in una petri di 40 mm di diametro e 20 di altezza:

1. Eliminare il terreno di coltura.
2. lavare una volta le cellule con almeno 2ml di PBS
3. eliminare il PBS e aggiungere 1 ml di 10% TCA
4. incubare a 4 °C per circa 60 minuti.

5. eliminare il TCA e sciacquare le cellule 5 volte con acqua; dopo l'ultimo lavaggio lasciare asciugare.
6. aggiungere 1ml di SRB in soluzione in ogni petri.
7. incubare a temperatura ambiente per 30 minuti.
8. eliminare il colorante e lavare le petri rapidamente 4 volte con acido acetico 1%; dopo l'ultimo lavaggio lasciare asciugare le petri.
9. aggiungere 1ml di 10 mM Trizma a ogni petri
10. incubare in movimento per circa 1 ora.
11. legger l'assorbanza a 560 nm

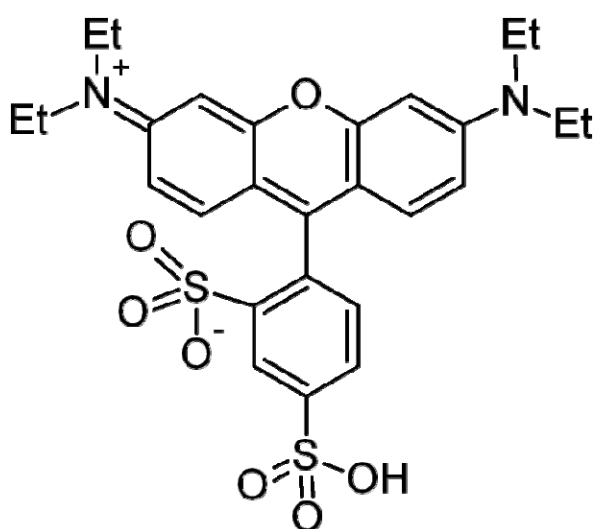


Fig. 2.28: Struttura di sulforodamina B.

2.4.7 Microscopia elettronica a scansione (SEM)

Un normale microscopio elettronico SEM a catodo di tungsteno ha un potere di risoluzione che si aggira intorno ai 5 nm e quindi consente di osservare le caratteristiche morfologiche del campione analizzato solo a livello superficiale.

Prima dell'osservazione, i campioni devono essere opportunamente processati secondo opportuni passaggi: fissazione in glutaraldeide al 2,5% in tampone fosfato 0,15M, lavaggi in tampone fosfato 0,15M, post-fissazione in osmio, lavaggi in H₂O distillata, disidratazione, essiccazione, montaggio sul supporto metallico chiamato STUB costituito da materiale conduttivo generalmente rame o alluminio ed infine Sputtering o ricopertura ovvero ricopertura del campione con film conduttivi quali oro, platino e carbone scelti in funzione della risoluzione voluta.

2.4.8 Microscopia elettronica a trasmissione (TEM)

La TEM è una tecnica microscopica che consente di osservare caratteristiche ultrastrutturali nell'ordine di nanometri di preparati opportunamente inclusi in resine (epossidiche, acriliche) e sezionati all'ultramicrotomo. I campioni, prima di essere osservati, sono processati secondo il seguente protocollo: fissazione in glutaraldeide 2.5% in tampone, lavaggi in tampone, post fissazione in tetrossido di osmio, disidratazione nella serie crescente degli alcoli, sostituzione dell'alcool assoluto con ossido di propilene, impregnazione in miscele di ossido di propilene e resina e inclusione in resina pura.

Questo protocollo è stato utilizzato nel trattamento di campioni costituiti da HYAFF-11[®], mentre per scaffold di PLLA e PPDL, a causa della loro dissoluzione in seguito al contatto con ossido di propilene, è stato usato il seguente protocollo: fissazione in paraformaldeide al 4% in tampone overnight a 4 °C, lavaggi in tampone, disidratazione nella serie crescente degli alcoli, infiltrazione in resina acrilica pura per 4 h a temperatura ambiente e ulteriori 12 h a 4 °C, e infine lasciati polimerizzare in una miscela costituita da resina e catalizzatore per 72 h a 4 °C sotto l'azione dei raggi UV.

2.4.9 Colorazione con Ematossilina Eosina (EE)

Per valutare il grado di penetrazione delle cellule all'interno degli scaffold polimerici sono state eseguite criosezioni successivamente colorate con Ematossilina (contrastante nucleare) ed Eosina (contrastante citoplasmatico) (Sigma Aldrich) ed infine osservate al microscopio ottico.

I vari scaffold sono stati quindi fissati in formalina al 10%, incorporati in paraffina e tagliati al microtomo per ottenere sezioni dello spessore di 3 µm circa.

A questo punto si è eseguita la contro colorazione con EE. Tale procedura prevede innanzitutto l'eliminazione della paraffina tramite idratazione, ovvero lavaggi in: xilitolo, alcool 100%, alcool 96%, alcool 70%, acqua; successivamente si è proceduto con la colorazione vera e propria con EE ed infine con la disidratazione del campione (lavaggi in: acqua, alcool 70%, alcool 96%, alcool 100%, xilitolo) in modo da eseguire il montaggio del campione su vetrino utilizzando Balsamo del Canada.

2.4.10 Immunoistochimica

L'immunoistochimica è una metodica che serve per rivelare, in una sezione di tessuto, la presenza di determinate sostanze tramite l'utilizzo di reazioni antigene-anticorpo e andando ad evidenziare dove questo complesso viene a formarsi.

Il processo immunoistochimico inizia deparaffinando le sezioni immergendole 2 volte in xilolo per 15 minuti; le stesse vengono poi reidratate in una scala alcoolica decrescente (alcool 100%, alcool 95%, alcool 70%) e infine in acqua distillata.

Per ripristinare gli antigeni alterati dal processo di fissazione (l'aldeide formica crea una sorta di reticolo con i gruppi amminici delle proteine rendendo impossibile l'interazione con i rispettivi anticorpi), si procede al loro recupero mediante l'Antigen Retrieval. Si immergono le sezioni in una soluzione di tampone citrato pH=6 e si effettua un ciclo di autoclave a 121 °C per 30 minuti in modo da liberare gli epitopi dal reticolo formalinico sfruttando la capacità del calore di allentare i legami tra gli amminoacidi, e l'uso di tamponi che ci consentono di mantenere il pH costante.

I successivi passaggi prevedono il raffreddamento delle sezioni per 20 minuti a temperatura ambiente per consentire alle proteine, denaturate col calore, di ritornare alla loro conformazione ma tenendo liberi i siti antigenici, e 3 rapidi lavaggi in acqua distillata per rimuovere eccessi o depositi di tampone.

La rilevazione del segnale di reazione prevede l'utilizzo di un sistema immunoenzimatico basato sull'attività ossido-reduttasica delle perossidasi; è quindi necessario effettuare il blocco delle perossidasi endogene (enzima largamente presente in molti dei nostri tessuti) in modo da ridurre al minimo la possibilità di colorazioni aspecifica. Il blocco delle perossidasi endogene viene eseguito immergendo al buio le sezioni in una soluzione contenente perossido di idrogeno (Carlo Erba Reagenti s.p.a) al 3% in alcool metilico assoluto (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Dopo 5 minuti le sezioni vengono accuratamente lavate con TBS 1x (Tris 10 mM, NaCl 150 mM). Successivamente si procede incubando, in camera umida a temperatura ambiente, le sezioni per 5 minuti col reagente Protein Block (Novolink Max Polymer Detection System; Novocastra) per ridurre la possibilità di un legame aspecifico degli anticorpi primari. Dopo i due lavaggi da 5 minuti in TBS 1x, le sezioni sono incubate con gli anticorpi primari

opportunamente diluiti in BSA (Bovin Serum Albumin; Sigma Aldrich) in soluzione all'1% con tampone PBS.

Gli anticorpi primari specifici utilizzati sono stati: anti connessina-43, anti-actina (muscolo liscio) ed anti-fibronectina (BD Chemicon).

Dopo ulteriori lavaggi in TBS 1x per migliorare la penetrazione del successivo reagente polimerico le sezioni sono incubate per 30 minuti a temperatura ambiente con il reagente Post Primary Block (Novolink Max Polymer Detection System; Novocastra) che ci permette di bloccare la reazione dell'anticorpo primario. Le sezioni sono trattate, previo lavaggio in TBS, con il reagente Novolink Polymer (Novolink Max Polymer Detection System; Novocastra), che riconoscendo immunoglobuline di topo e di coniglio rende possibile la determinazione degli anticorpi legati ai nostri tessuti. L'incubazione col reagente polimerico viene effettuata sempre a temperatura ambiente per 30 minuti.

Al termine, le sezioni sono accuratamente lavate con TBS 1x per eliminare l'eccesso di anticorpo che non si è legato e per riequilibrare il pH; tappa importante perchè se non eseguita correttamente può incidere sui risultati della reazione portando così a dei falsi positivi. Successivamente le sezioni sono incubate col substrato per la precipitazione colorimetrica costituito da DAB (3-3' Diaminobenzidina tetraidrocloruro). La soluzione del cromogeno viene sviluppata all'istante ed è preparata diluendo DAB col buffer di diluizione (DAB Substrate Buffer) contenente perossido di idrogeno fornito anch'esso dal kit Novolink. DAB è una sostanza che dopo l'ossidazione prodotta dall'enzima, in presenza di perossido di idrogeno produce una intensa colorazione marrone nella zona di positività, non solubile in acqua o alcol. Dopo circa 30 secondi, la reazione perossidasi viene bloccata ponendo le sezioni in acqua distillata. Al termine della reazione si procede con il contrasto nucleare con ematossilina di Gills per ottenere una colorazione di contrasto che ci permetta di constatare meglio l'effettiva positività o negatività della nostra reazione. Terminato il contrasto, si procede alla disidratazione delle sezioni con passaggi da tre minuti ciascuno in una serie crescente di alcool etilico: alcool 70%, alcool 95%, alcool 100% e alla chiarificazione in soluzioni diafanizzanti come lo xilolo (Bioclear) per essere poi montate con resina Bio-mount (Bio-Optica) permettendo una conservazione permanente delle stesse.

2.4.11 Estrazione di proteine e Western Blotting

Il western blotting è una tecnica biochimica che permette di identificare una determinata proteina mediante il riconoscimento da parte di anticorpi specifici.

Gli estratti proteici totali ottenuti da cellule raccolte in terreno di coltura sono state centrifugate e risospese in tampone di lisi (DTT 5 mM, EDTA 2 mM, CHAPS 0.1 %, Triton 0.1 %) contenente inibitori di proteasi. L'omogenato cellulare dopo esser stato sonificato per 2 min a 38 kHz è stato centrifugato a 12000 g per 10 min. Il sovranatante è stato utilizzato per il dosaggio di proteine secondo il metodo Bradford e successivamente diluito in loading buffer (SDS 2%, glicerolo 5%, blu di bromo fenolo 0.002 %, beta-mercaptoetanolo 4% in Tris-HCl 0.25 M a pH 6.8) e denaturato portandolo a ebollizione per 3 min. Aliquote corrispondenti a 30 µg di proteina sono state analizzate mediante elettroforesi SDS-PAGE (gel 12%) per 90 min a 150 V. Le proteine sono state trasferite su membrana di nitrocellulosa mediante blottaggio a 100 V per 60 min. Le membrane sono state saturate con latte in polvere al 5% in tampone TBS-Tween (Tris-HCl 10 mM pH8, NaCl 150 mM, Tween 20 0.05%) per 60 min a temperatura ambiente. Successivamente le membrane sono state incubate con l'anticorpi primario diretto contro la proteina β -actina (Sigma Aldrich) per 90 min a temperatura ambiente . Dopo tre lavaggi in PBS-Tween, le membrane sono state incubate con l'anticorpo secondario specifico(diluito 1:2500 in latte al 5% in TBS- Tween) coniugati con HRP (Horse Radish Peroxidase). Dopo alcuni lavaggi che hanno consentito l'allontanamento di un eccesso di anticorpo, le bande immunoreattive sono state visualizzate su pellicola fotografica Kodak X-OMAT AR, dopo trattamento con luminolo ECL (Enhanced ChemioLuminescence) [72].

2.4.12 Estrazione di RNA totale ed RT-PCR

Il protocollo utilizzato nell'estrazione di RNA totale è stato il seguente:

1. Utilizzare di 1 mL di Trizol Reagent che consiste di una miscela di fenolo isotiocianato e cloroformio (Invitrogen) per 10^6 cellule circa.
2. Incubare i campioni a temperatura ambiente per permettere la dissociazione completa dei complessi nucleoproteici.
3. Aggiungere 200 µL di cloroformio per mL di Trizol impiegato.

4. Agitare vorticosamente per 15 secondi.
5. Incubare per 3 minuti a temperatura ambiente.
6. Centrifugare a 12000 g per 15 minuti a 4 °C. Dopo la centrifugazione la miscela è separata in una fase organica rosacea apolare più bassa (fenolo-cloroformio), un'interfase, ed una fase acquosa superiore incolore. L'RNA rimane esclusivamente nella fase acquosa.
7. Aggiungere alla fase acquosa 500 µL di isopropanolo per mL di Trizol utilizzato per permettere la precipitazione dell'RNA.
8. Incubare i campioni a temperatura ambiente per 10 minuti
9. Centrifugare a 12000 g per 10 minuti a 4 °C per fare depositare il pellet di RNA.
10. Rimuovere il surnatante.
11. Lavare il pellet con etanolo al 75% (1 mL per mL di Trizol utilizzato) per rimuovere i sali.
12. Centrifugare a 7500 g per 5 minuti a 4 °C.
13. Essiccare il pellet.
14. Disciogliere il pellet, al fine di preservare l'RNA dalla digestione di eventuali RNAasi, con 10 µL della miscela contenente in proporzione 39 unità di H₂O-RNAasi free e 1 unità di inibitore RNAasi,
15. Incubare i campioni per 10 minuti a 55 °C.
16. Determinare la concentrazione di mRNA mediante lettura dell'assorbanza alla lunghezza d'onda di 260 e 280 nm.

Ottenuta la concentrazione di RNA si procede con la metodica prevista per RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) [73] la quale è stata eseguita utilizzando una soluzione del volume di 50 µL contenente: 0.1 U/µL AMV reverse transcriptase, 0.1 U/µL DNA polymerase, dNTPs mix (0.2 mM per ogni dNTP), MgSO₄ 1 mM, upstream e downstream primers 100 pmol, AMV reaction buffer ed acqua nuclease-free per raggiungere il volume finale (Promega Corporation). I primer senso ed antisense utilizzati nella determinazione della di GAPDH sono stati rispettivamente 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' e 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3' (Invitrogen). Successivamente, 10 µL di ogni prodotto di amplificazione sono stati separati tramite elettroforesi orizzontale utilizzando un gel di agarosio al 2% in tampone TBE (Tris borato 45 mM, EDTA

1 mM a pH 8). Infine, le fotografie del gel sono state ottenute esponendo il gel stesso ai raggi UV emessi da un transluminatore.

2.4.13 Analisi statistica dei dati

I risultati ottenuti sono espressi come media \pm SEM. L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il test di analisi della varianza one-way ANOVA, seguito dal test di Bonferroni per la composizione di medie di valori multipli. I valori ottenuti sono stati considerati statisticamente significativi per $p < 0.05$.

3 – SCOPO DELLA RICERCA

La ricerca nello sviluppare un tessuto cardiaco ingegnerizzato, da impiantare nel miocardio infartuato, nasce dall'esigenza di ricercare un'efficace alternativa al trapianto d'organo.

In questi ultimi anni è giunta in fase di studio sperimentale la somministrazione di cellule staminali derivate dal midollo osseo nelle coronarie (somministrazione intracoronarica), nel ventricolo (somministrazione transendocardica) e nel muscolo cardiaco durante la realizzazione di un bypass (somministrazione intramiocardica), ma attualmente non sono state ancora individuate delle strategie clinicamente valide finalizzate alla riparazione del miocardio infartuato. I principali ostacoli nascono, da un lato, dall'impossibilità di realizzare in laboratorio dei preparati cellulari che si adattino funzionalmente al tessuto cardiaco in seguito al loro trapianto nell'area infartuata, dall'altro di mantenere attivo da parte del tessuto cardiaco lesionato il richiamo di cellule staminali endogene per un periodo sufficientemente lungo da permettere alle stesse di differenziare e organizzarsi secondo un'architettura strutturale idonea al processo di contrazione tipica di un cuore sano.

Una strategia alternativa, o complementare alla singola terapia cellulare, è quella di impiantare nel tessuto danneggiato un costrutto ingegnerizzato precedentemente stimolato in bioreattore in grado di esercitare sulle cellule da trapiantare contrazioni ritmiche, che riproducano il più fedelmente possibile la dinamica di un cuore battente.

Lo scopo di questa ricerca è stato quindi fornire una valida alternativa strumentale a quelle già presentate da diversi gruppi di ricerca che si occupano di rigenerazione del miocardio infartuato, nel tentativo di ottenere una metodica standardizzata in grado di indirizzare cellule staminali mesenchimali di ratto indifferenziate verso l'acquisizione *in vitro* di caratteri fenotipici confrontabili con quelli delle cellule muscolari cardiache, proponendo il trapianto nell'organo infartuato di elementi cellulari già parzialmente adeguati alla funzione loro richiesta *in vivo*.

4 – RISULTATI E DISCUSSIONE

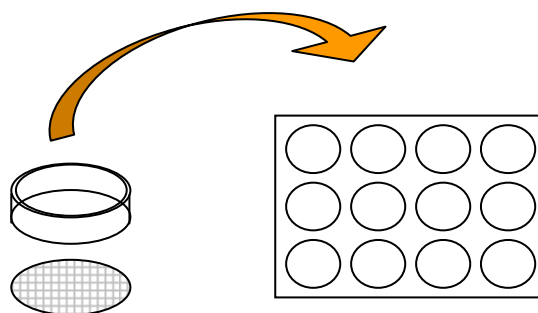
4.1 Acido poli-L-lattico (PLLA) e poli(ω -pentadecalattone) (PPDL) elettrofilati: scaffold innovativi per l'ingegneria dei tessuti

Gli scaffold a base di PLLA e PPDL sono stati realizzati tramite elettrofilatura dal gruppo di “Scienza dei polimeri” del Dipartimento di Chimica “G. Ciamician” di Bologna; questa collaborazione è nata dall'esigenza di mettere a punto una nuova tecnologia e una linea di produzione interna per la realizzazione di supporti polimerici innovativi, da un punto di vista delle proprietà chimico-fisiche e strutturali, da impiegare nell'ambito dell'ingegneria dei tessuti.

Una prima problematica da affrontare è stata la verifica della biocompatibilità degli scaffold, in termini di vitalità, proliferazione e crescita di una popolazione cellulare seminata a bordo. La semina su frammenti di elettrofilato di forma circolare posti all'interno di multiwell da 12 pozzetti, inizialmente utilizzata per questo genere di verifica, non ha dato risultati soddisfacenti perché oltre ad aderire alla superficie della matrice polimerica, le cellule crescevano anche sul polistirene, creando una forte variabilità dei risultati ottenuti. Quindi sono stati costruiti ad hoc anelli di Teflon PVDF (biocompatibile ed inerte) del diametro di 1.7 cm (che permetteva il loro inserimento nei pozzetti dei multiwell) su un lato dei quali far aderire gli elettrofilati fissati con un leggero strato di silicone (fig. 4.1).



a)



b)

Fig. 4.1: a) Anello in Teflon PVDF unito ad elettrofilato (“Tamburello”); b) Schema di montaggio.

In questo modo sono stati ottenuti dei contenitori (“tamburelli”) nei quali si è avuta la sicurezza di seminare in uno spazio confinato sempre lo stesso numero di cellule.

Per la caratterizzazione di queste prove, è stata utilizzata una popolazione di cardiomioblasti ventricolari di embrione di ratto (H9c2) costituita da cellule già parzialmente differenziate verso un fenotipo cardiaco e più facilmente reperibili delle MSCs le quali prevedono, per il loro isolamento, il sacrificio di animali.

4.1.1 PLLA amorfo e semicristallino

Il PLLA è un polimero ampiamente utilizzato nell'ambito dell'ingegneria dei tessuti e nella preparazione di presidi biomedicali, e le sue caratteristiche di biocompatibilità sono ormai note dalla letteratura.

Nel corso di questa ricerca sono state studiate due tipologie di matrici (scaffold), costituite da fibre nanometriche, entrambe a base di PLLA ma differenti in termini di struttura sopramolecolare, ovvero alternativamente in forma amorfa o in forma semicristallina. Quest'ultima, caratterizzata da una maggiore rigidità delle fibre, è stata ottenuta mediante immersione del polimero amorfo in etanolo 96% a 37 °C per 24 ore.

Lo scopo di questo studio è stato valutare se una maggiore flessibilità strutturale della matrice polimerica impiegata (PLLA amorfo vs PLLA semicristallino) permettesse alle cellule di penetrare attraverso le fibre dando origine a uno pseudotessuto dotato di un'architettura tridimensionale più vicina a quella di un tessuto reale.

25000 cellule della linea H9c2 sono state seminate all'interno dei "tamburelli" precedentemente descritti (figura 4.1) e mantenute in coltura per 14 giorni (quattro esperimenti separati ognuno costituito da 3 replicati). Prove di vitalità e crescita cellulare sono state eseguite grazie al test Alamar Blue[®] effettuato a giorni alterni.

Nel grafico in figura 4.2 è rappresentata la curva di crescita cellulare espressa come segnale di fluorescenza (unità arbitrarie) letta alla lunghezza d'onda di 540 nm (Ex 590 nm). Come superficie di riferimento per la crescita si è adoperato il polistirene, il materiale che costituisce le piastre di coltura standard.

L'efficienza dell'adesione cellulare sulle due matrici polimeriche da testare è risultata paragonabile, sebbene inferiore a quella ottenuta sul polistirene. A fronte di circa 25000 cellule presenti un giorno dopo la semina su PLLA, amorfo o semicristallino, orientativamente il doppio aveva aderito alla superficie del controllo. Ovviamente, un numero maggiore di cellule di partenza favorisce un più

rapido raggiungimento della confluenza sul polistirene (170000 cellule al giorno 9). D'altronde, le cellule in crescita sul PLLA proliferano con un coefficiente angolare paragonabile, e raggiungono al quattordicesimo giorno la stessa densità realizzata sul materiale di riferimento.

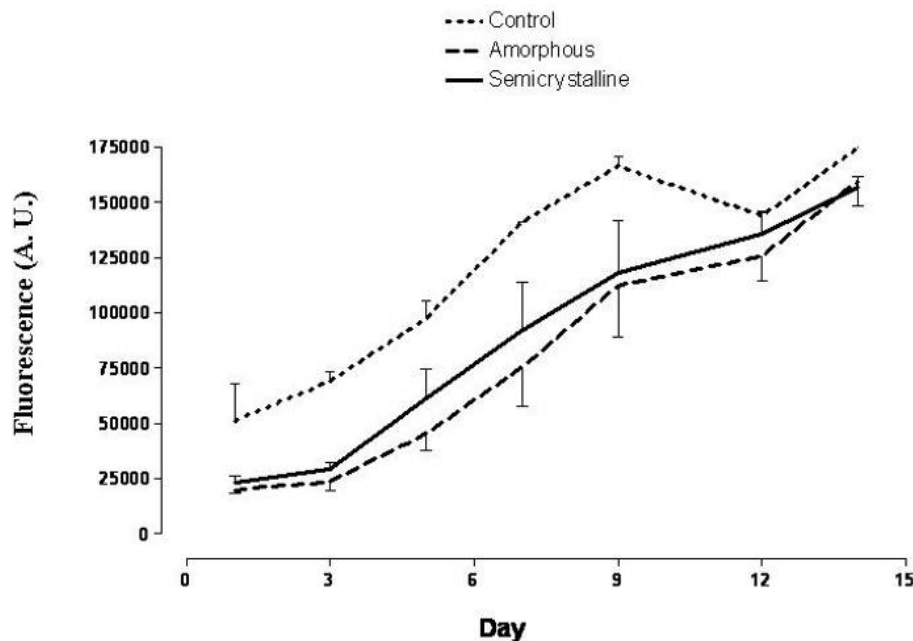


Fig. 4.2: Curva di crescita su PLLA amorfo e semicristallino.

Entrambe le configurazioni degli scaffold di PLLA, al termine del test, sembrano mostrare uno stesso numero di cellule, escludendo quindi differenze significative in termini di biocompatibilità. Questi dati non mettono in luce però come avvenga la colonizzazione cellulare: per questa ragione sono state eseguite indagini al SEM in modo da valutare il grado di penetrazione delle cellule attraverso lo spessore degli scaffold.

Nel PLLA amorfo (figura 4.3) le H9c2 sono state in grado di colonizzare anche il versante opposto, e per farlo hanno dovuto necessariamente farsi strada attraverso le maglie del polimero. Negli scaffold a fibre semicristalline (figura 4.4) invece, la superficie opposta a quella di semina appare priva di cellule che si suppone abbiano avuto difficoltà ad attraversare lo spessore della matrice.

Questi dati sono stati confermati dai risultati ottenuti dalle analisi istologiche in microscopia ottica di preparati colorati con ematossilina/eosina (figura 4.5).

Le superfici di sezione dei costrutti analizzati dopo 14 giorni di crescita cellulare mostrano una maggiore penetrazione nello spessore nella matrice realizzata con fibre amorse. In aggiunta, sul versante opposto a quello di semina è stata rilevata la presenza di cellule che sembrano invece mancare nella matrice realizzata con fibre semicristalline, in accordo con i risultati ottenuti al SEM.

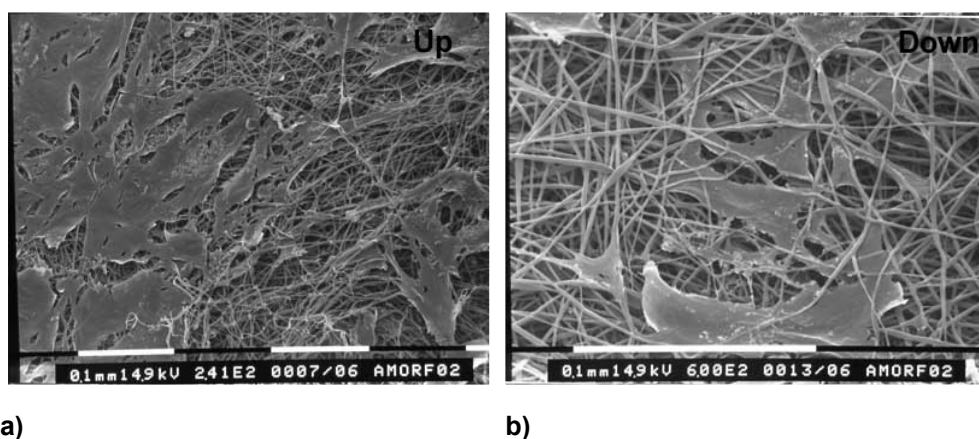


Fig. 4.3: a) PLLA amorpho versante superiore; b) PLLA amorpho versante inferiore.

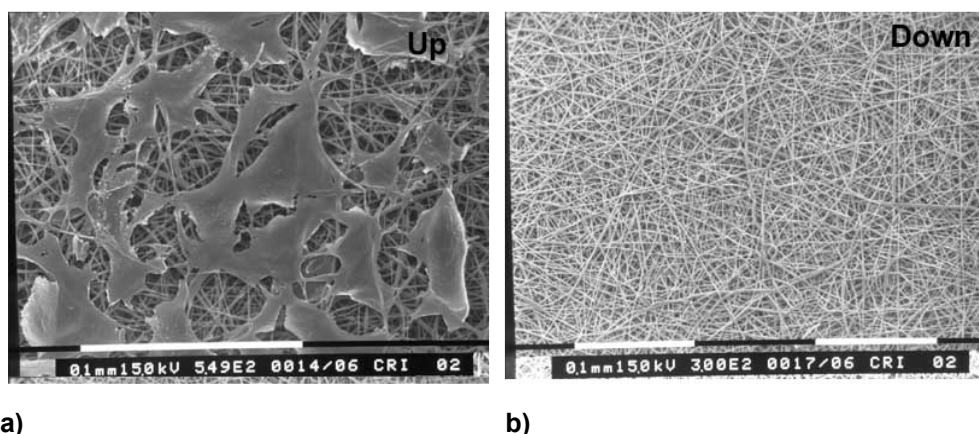
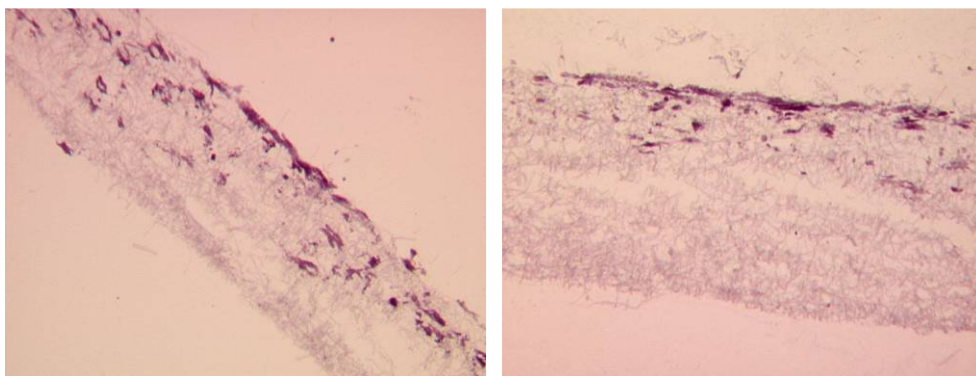


Fig. 4.4: a) PLLA semicristallino versante superiore; b) PLLA semicristallino versante inferiore.

Lo studio presentato indica quindi la possibilità di ottenere una variazione della colonizzazione cellulare di una matrice tridimensionale attraverso la modificazione di parametri che influenzano le proprietà fisiche e strutturali del polimero con il quale è realizzata. L'irrigidimento delle fibre di PLLA in seguito a trattamento con etanolo, sebbene non abbia determinato variazioni sull'adesione e proliferazione cellulare rispetto allo stato amorfo, ha influito negativamente sul grado di penetrazione, originando una sorta di reticolo compatto che ha contrastato il processo di migrazione delle cellule attraverso lo spessore.



a)

b)

Fig. 4.5: Colorazione con EE: a) Sezione di PLLA amorfo; b) Sezione di PLLA semicristallino.

La flessibilità delle fibre che costituiscono lo stato amorfo di PLLA ha permesso alle cellule di insinuarsi al suo interno. L'importanza di questa proprietà è ovvia quando si voglia riprodurre in vitro uno pseudotessuto tridimensionale che mimì le caratteristiche di un tessuto biologico caratterizzato da una distribuzione multistrato. Inoltre, l'elasticità delle fibre è una proprietà conveniente nel caso in cui si sottoponga il costrutto ad una coltura dinamica, in particolare in caso di deformazione del supporto e a maggior ragione se tale deformazione ha carattere ciclico.

4.1.2 PPDL

Il PPDL è un polimero di sintesi di recente caratterizzazione e dotato di un'ottima stabilità termica e buone proprietà meccaniche.

Per integrare le informazioni presenti in letteratura sulla sua biocompatibilità, in questo studio è stato valutato oltre che per la sua capacità di sostenere adesione e proliferazione cellulare anche per l'eventuale liberazione di sostanze citotossiche seguendo il protocollo ISO10993-5 (standard internazionale per la valutazione biologica di dispositivi biomedicali). Un campione di PPDL, dopo opportuna procedura di sterilizzazione (vedi paragrafo 2.4.2), è stato posto a contatto con terreno di coltura completo DMEM (5 mg/mL) in incubatore per 24 ore; successivamente il terreno è stato filtrato e sostituito al medium di coltura di cellule H9c2 seminate 48 ore prima. Dopo un'incubazione di 24 ore la vitalità cellulare è stata valutata utilizzando il saggio colorimetrico a base di sulforodamina B. Sono stati eseguiti due esperimenti separati, ognuno caratterizzato da 6 replicati,

utilizzando come controllo negativo di citotossicità terreno di coltura che non era stato precedentemente incubato con PPDL e come controllo positivo terreno addizionato di H_2O_2 1mM (per 120 minuti 48 ore dopo la semina).

Nel grafico presentato in figura 4.6 sono mostrati i valori di assorbanza, relativi alle cellule coltivate con medium standard (DMEM) e con medium preincubato con PPDL (PPDL).

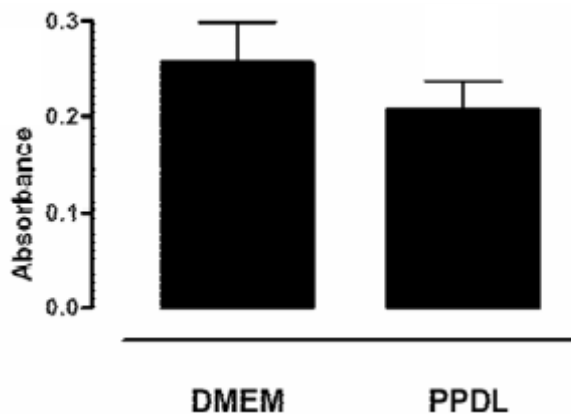


Fig. 4.6: Valutazione della citotossicità indiretta.

I valori di assorbanza ottenuti dalle cellule cresciute in medium standard sono paragonabili a quelli ottenuti utilizzando il medium preincubato con PPDL; al contrario, quando le cellule sono state trattate con H_2O_2 1mM per 120 minuti si è verificata totale morte cellulare (non in figura).

Quindi, i risultati ottenuti dimostrano assenza di prodotti citotossici rilasciati dal PPDL in accordo con recenti test di citotossicità indiretta applicati alla linea fibroblastoide 3T3 presenti in letteratura [74].

Per quanto concerne la vitalità cellulare è stato eseguito il test Alamar Blue® applicando il protocollo descritto in precedenza per il PLLA.

Come già avvenuto per il PLLA, i risultati ottenuti hanno mostrato come la quantità di cellule riferibile al giorno successivo alla semina sia inferiore a quella presente sul polistirene, usato ancora una volta come materiale di riferimento. Questo si accompagna a un evidente rallentamento in termini di proliferazione e crescita cellulare. La densità cellulare, dopo 14 giorni di coltura, non raggiunge quella del controllo (fig. 4.7). Tuttavia, in un singolo esperimento, al quale si riferisce la figura 4.8, la popolazione cellulare è stata seguita fino a 27 giorni in coltura, un limite al quale la densità di crescita su PPDL equivaleva a quella sul polistirene.

Quindi l'inconveniente di una ridotta adesione/proliferazione delle cellule su PPDL può essere ovviato da un tempo di coltura più lungo.

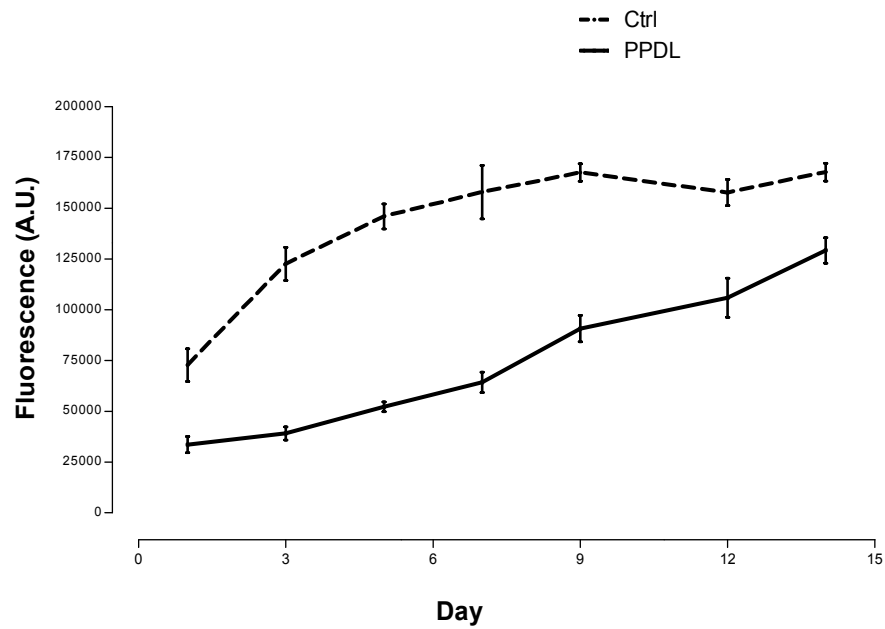


Fig. 4.7: Curva di crescita su PPDL (14 giorni).

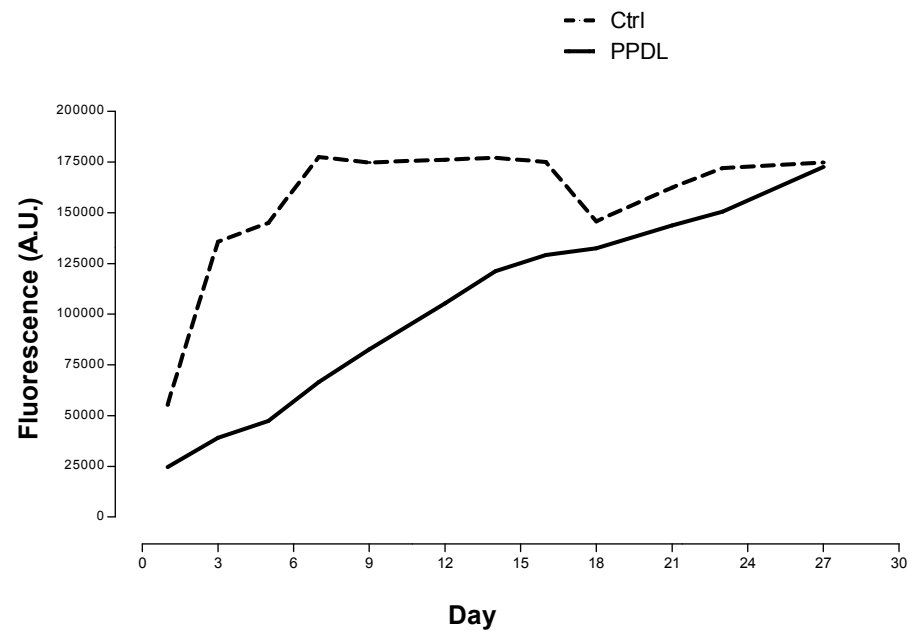


Fig. 4.8: Curva di crescita su PPDL (27 giorni).

Questi risultati vengono confermati, dall'indagine al SEM, che mostra come dopo

14 giorni di coltura le cellule ricoprono lo scaffold in maniera incompleta permettendo la visualizzazione delle fibre sottostanti (fig. 4.9a,b), mentre dopo 27 giorni di coltura si abbia il completo rivestimento della superficie disponibile (fig. 4.9c,d). La densità cellulare osservata al SEM e i risultati ottenuti dai test di citotossicità indiretta, di adesione e di proliferazione indicano chiaramente che il PPDL, elettrofilato per la prima volta in fibre nanometriche, sia biocompatibile e in grado di promuovere l'adesione e proliferazione cellulare.

Si noti che, a differenza dai poliesteri alifatici come il PLLA, il PPDL presenta un'elevata idrofobicità, una caratteristica che lo inserisce nel gruppo dei polimeri non biodegradabili. Per questa ragione, il suo utilizzo non è indicato in situazioni che richiedano l'impiego di matrici polimeriche a rapida degradazione.

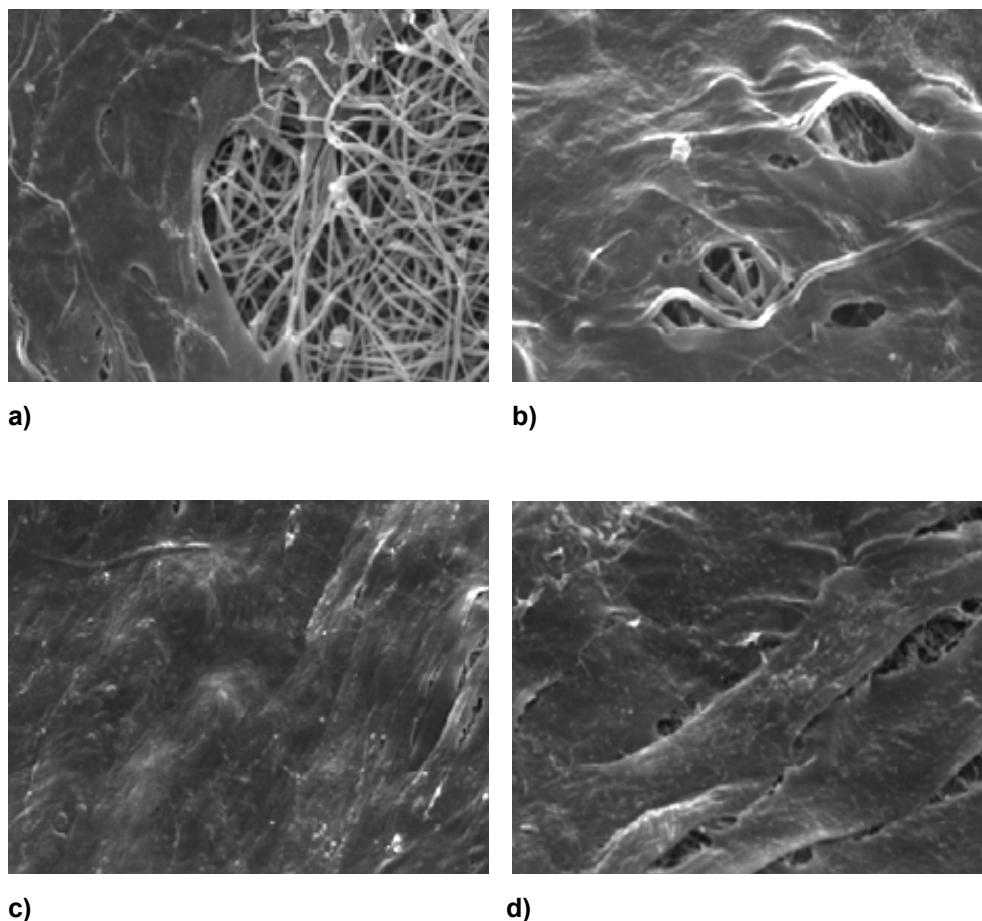


Fig. 4.9: a) e b): coltura di 14 giorni; c) e d): coltura di 27 giorni.

4.2 Coltura dinamica nel prototipo di bioreattore

La messa in opera dei protocolli di coltura dinamica in bioreattore è stata preceduta, in fase di realizzazione del prototipo, da prove di biocompatibilità eseguite su diversi materiali plastici polimerici potenzialmente utilizzabili nella costruzione del dispositivo, per via delle loro specifiche proprietà chimico-fisiche e meccaniche, quali elevata resistenza al calore, inerzia chimica, basso livello di creep (deformazione plastica).

Il lavoro qui presentato riguarda il collaudo sperimentale della macchina, in stretta collaborazione con gli ingegneri meccanici ed elettronici responsabili del progetto per modificare e ottimizzare, agendo in corso d'opera, le sue caratteristiche strutturali e funzionali.

4.2.1 Biomateriali utilizzati: prove di biocompatibilità

Il bioreattore è stato concepito e realizzato in modo da essere provvisto di una camera che svolge la funzione di un tipico incubatore, costituendo un vero e proprio microambiente nel quale far crescere le cellule in sterilità e in condizione controllate di temperatura, umidità relativa e concentrazione ambientale di CO₂; la scelta del materiale appropriato è stata di fondamentale importanza per evitare eventuale liberazione da parte del biopolimero utilizzato (p. es. a seguito di trattamento con alte temperature e/o raggi UV necessari per la sua sterilizzazione) di sostanze tossiche verso le cellule in coltura.

Le prove di biocompatibilità/citotossicità sono state eseguite ponendo un campione del polimero da testare in immersione in una coltura cellulare di riferimento e valutando rispettivamente l'eventuale sofferenza cellulare (vedi pag. 13).

Inizialmente, il materiale scelto per la costruzione della camera del bioreattore è stato un omopolimero di poliossimetilene POM (Tecaform AD o Delrin®), un materiale approvato per uso alimentare dalla FDA (Food and Drug Administration) dotato di proprietà chimico-fisiche adeguate. In modo inatteso il Delrin® ha liberato in coltura a 37 °C sostanze tossiche che hanno provocato la morte di tutte le popolazioni cellulari utilizzate nel test: MSCs, H9c2 e C127 (cellule di epitelio mammario di topo) (fig. 4.10).

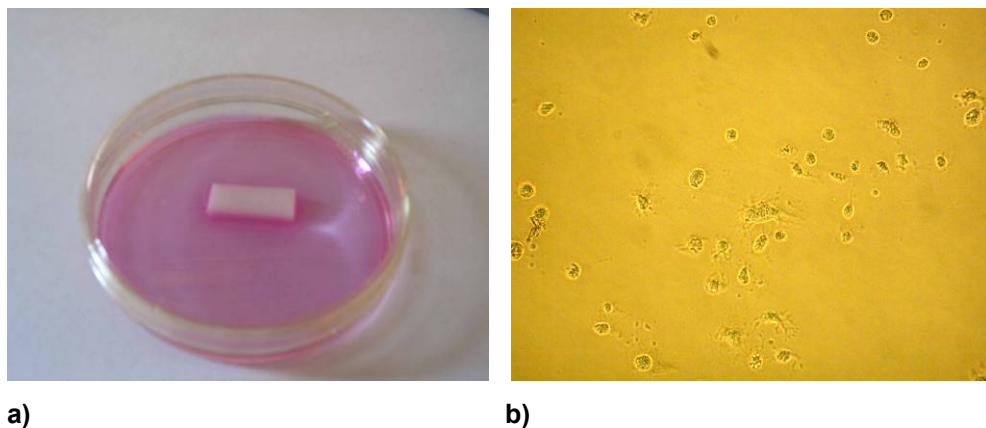


Fig. 4.10: a) Campione di Delrin®; b) Morte cellulare di MSCs evidenziata in microscopia ottica.

La tossicità si manifestava anche quando il polimero non era a contatto con il terreno di coltura, il che suggerisce che esso sia stato in grado di scambiare con il medium componenti volatili all'interno dello spazio confinato della petri mostrata in fig. 4.11 posta in incubatore a 37°C.

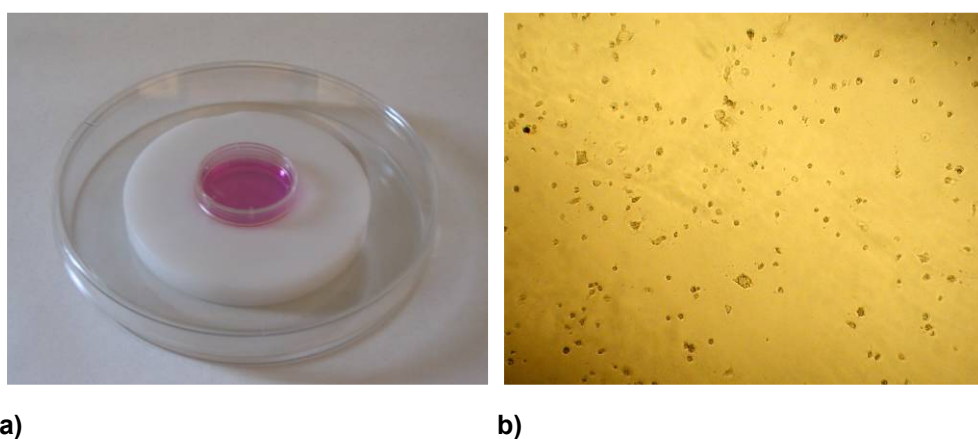


Fig. 4.11: a) Anello di Delrin®; b) Morte cellulare di MSCs evidenziata in microscopia ottica.

Nonostante il Delrin® sia approvato dalla FDA, in letteratura sono presenti pareri discordanti sull'effettiva capacità di questo materiale di costituire un ambiente adeguato alla crescita cellulare. Infatti, mentre studi di biocompatibilità effettuati da Penick et al. [75] indicano completa assenza di fenomeni citotossici anche a lungo termine, il lavoro di Laluppa et al. [76] suggerisce possibilità di liberazione nel terreno di coltura di sostanze letali.

L'utilizzo da parte di questi due gruppi di ricerca di popolazioni cellulari differenti, rispettivamente MSCs e cellule progenitrici ematopoietiche entrambe umane, aveva fatto avanzare l'ipotesi [Penick et al.] che la tossicità del POM fosse

specifica per alcuni tipi cellulari. Alla luce dello stesso risultato negativo nei confronti dei tre tipi di cellule qui utilizzati questa interpretazione sembra da abbandonare. Una spiegazione più attendibile e realistica va invece ricercata nella metodica di sintesi del Delrin®. Questo viene infatti realizzato attraverso la polimerizzazione della formaldeide (CH_2O), in presenza di stabilizzanti e/o collanti che potenzialmente possono interferire con il processo, rendendo instabile la catena polimerica e provocandone, in seguito a riscaldamento, rottura con rilascio di unità monomeriche di formaldeide e/o derivati tossici.

In alternativa al Delrin® è stata quindi valutata la biocompatibilità dei seguenti materiali: PP-DWN (Moplen), Tecasone, Tecapeek e Tecaflon PVDF. Tutti questi polimeri candidati ad essere impiegati nella costruzione del compartimento di coltura del bioreattore hanno superato la prova di biocompatibilità (dati non mostrati). Tecapeek (polietereterchetone) e Tecaflon PVDF (polivinilidendifluoruro), che hanno prodotto i risultati migliori, sono stati scelti come componenti della camera di coltura. In particolare, il Tecapeek è stato utilizzato nella realizzazione della parte più strettamente a contatto con la popolazione cellulare (base) (fig. 4.12).



Fig. 4.12: Base del bioreattore in Tecapeek

4.2.2 Sterilizzazione

La standardizzazione di una metodica di sterilizzazione rapida, pratica, efficace, a basso costo e non deleteria per i componenti meccanici ed elettrici della camera di coltura del bioreattore è stata realizzata attraverso un percorso “trial and error”, giustificato dall’indisponibilità di un servizio centralizzato, interno alla nostra Istituzione, al quale fare riferimento. Incidentalmente, fare ricorso a un’azienda privata per il trattamento in ossido di etilene sarebbe stato sostenibile

economicamente ma avrebbe richiesto per ogni operazione di sterilizzazione una decina di giorni dal ritiro alla riconsegna dell'apparecchio, con tutti i rischi per il dispositivo derivanti dal trasporto.

La metodica finalmente impiegata realizza i passaggi descritti nel protocollo seguente:

- Sterilizzazione in autoclave di tutti i componenti smontabili e resistenti al calore e degli strumenti utilizzati nel montaggio.
- Utilizzo di spray germicidi (Biocidal ZFTM; Mycoplasma-off[®]) per la disinfezione delle superfici interne del bioreattore.
- Lavaggio con EtOH 70% di tutte le superfici interne, sonda di pH e faccia interna del coperchio del bioreattore.
- Bagno di EtOH 70% nella mini camera di coltura (2 applicazioni di 15 minuti ciascuna).
- Esposizione a raggi UV-C (2 trattamenti di 1 ora ciascuno).
- Utilizzo di guanti sterili per il montaggio dei vari componenti.

4.2.3 Termostatazione

La termostatazione della camera di coltura risponde all'esigenza di mantenere le cellule in crescita alla temperatura costante di 37 °C. Come mostrato in fig. 4.13, essa è stata ottenuta attraverso il riscaldamento di una piastra di alluminio posizionata sotto la camera di coltura del dispositivo in assetto operativo: la piastra può infatti scambiare calore con il terreno di coltura contenuto nella camera sovrastante. Il riscaldamento della piastra alla temperatura desiderata è stato ottenuto mediante un flusso continuo di acqua in temperatura controllata da un termostato collegato all'apparecchio. Tuttavia, la procedura descritta ha generato un problema inatteso: a fronte di una notevole rapidità di stabilizzazione della temperatura desiderata nel terreno di coltura, l'escursione termica tra la cameretta riscaldata a 37 °C e lo spazio circostante provoca l'evaporazione del medium con formazione di condensa che si deposita sulla superficie interna del coperchio della camera di coltura. La drastica riduzione del volume del terreno e la concentrazione dei soluti in esso disciolti provoca un rapido deterioramento delle condizioni colturali.

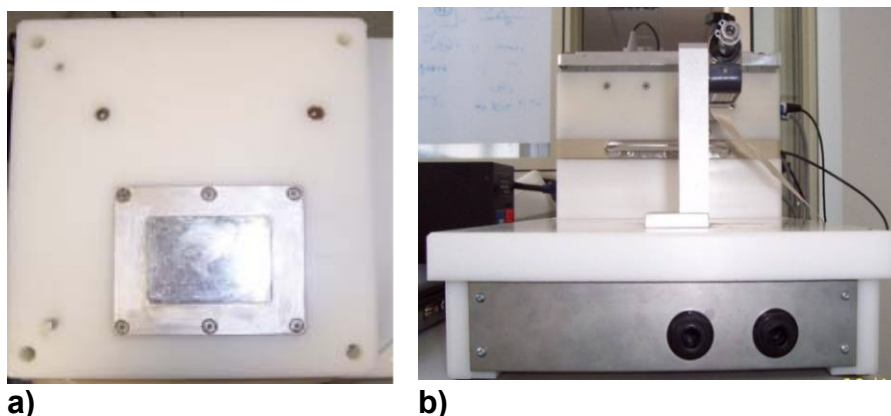


Fig. 4.13: a) Piastra in alluminio del sistema di termostatazione; b) Input ed output del circuito di riscaldamento.

Per controllare l'evaporazione del terreno, il coperchio della camera di coltura è stato quindi riscaldato mediante un sistema analogo a quello utilizzato per termostatazione della base, ovvero un flusso d'acqua attraverso una serpentina in gomma collegata a un secondo termostato impostato alla temperatura di 80 °C (per permettere al calore di oltrepassare lo spesso strato di plexiglass che costituisce la copertura della camera). Tale procedura non è stata sufficiente da sola a impedire la formazione della condensa, che continuava a ricoprire le pareti perimetrali della camera colturale. Affinchè la temperatura all'interno del bioreattore risultasse omogenea è stato necessario impedire la dispersione del calore generato dai flussi d'acqua riscaldati dai bagni termostatici mediante l'impiego di un materiale coibentante in associazione a uno strato di neoprene, dello spessore di 10 mm, di dimensioni tali da rivestire completamente il compartimento dedicato alla coltura dinamica. Con questo approccio, dall'iniziale riduzione del volume del terreno di coltura inferiore dell'ordine del 50% nell'arco di 24 ore, si è passati a una riduzione di circa l'1%. La figura 4.14 illustra qualitativamente le prove di controllo della temperatura e indica il protocollo finalmente prescelto. Sebbene questo risultato abbia consentito di utilizzare la macchina per la coltura cellulare, è auspicabile sfruttare l'esperienza accumulata per questa messa a punto nell'orientare un riprogettazione dei volumi e delle soluzioni per la termostatazione che semplifichino le procedure di utilizzo. Modificare la struttura della camera di coltura in modo da ottenere un vero e proprio incubatore dotato di termoregolazione elettronica indipendente da bagni termostatici, eventualmente arricchito con dispositivi di sicurezza di

sovratemperatura, è una soluzione forse dispendiosa da un punto di vista della realizzazione ma sicuramente da prendere in considerazione.

Un'alternativa più economica è quella appena descritta prevede l'impiego di cilindri termoconduttivi, collegati a una resistenza, da inserire in serie all'interno delle pareti che costituiscono la camera di coltura del bioreattore in modo da ottenere un'emissione di calore omogenea.

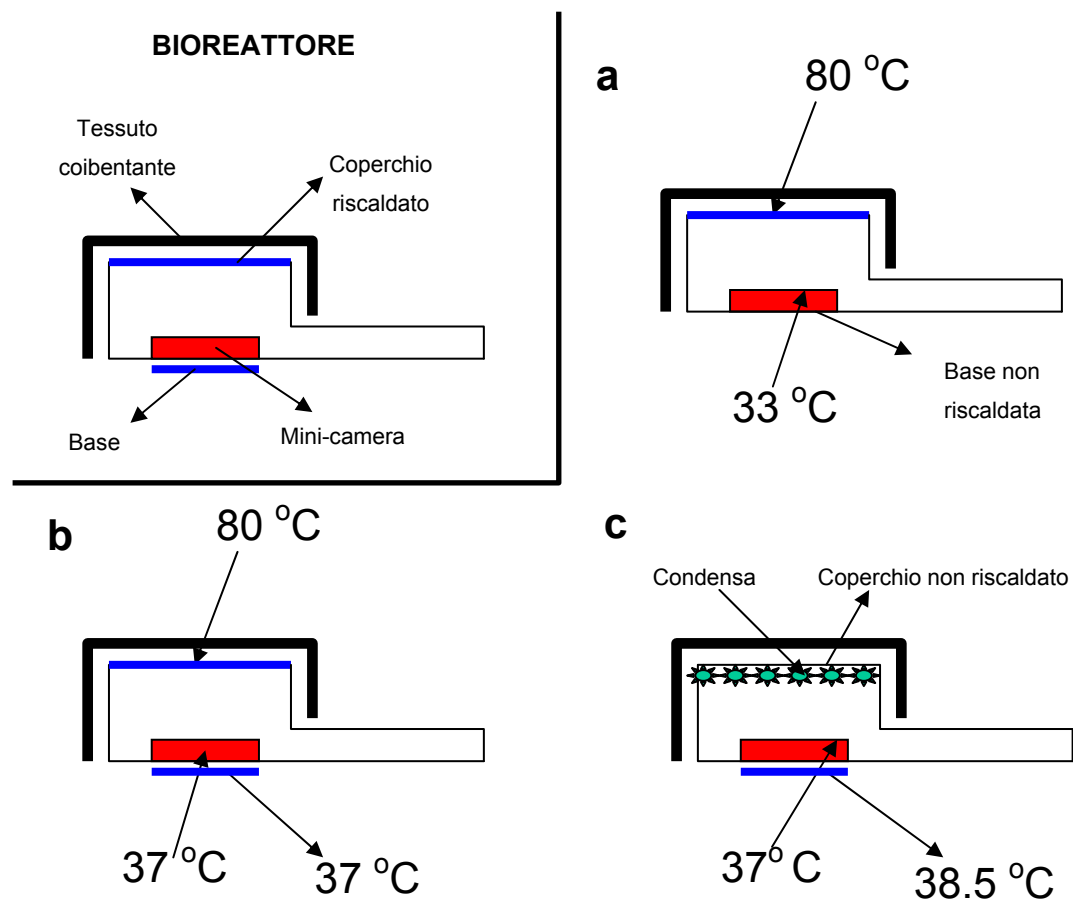


Fig. 4.14: Schema delle prove di termostatazione eseguite. a) Coperchio riscaldato ad 80°C , base non riscaldata: all'interno della cameretta si raggiunge una temperatura di 33°C dopo 40 min. b) Coperchio riscaldato a 60°C , base riscaldata a 37°C : all'interno della cameretta si raggiunge una temperatura di 37°C che viene mantenuta nel tempo, inoltre si forma una quantità di condensa trascurabile (perdita di 1.5 mL di terreno ogni 24 h su 50 mL inizialmente caricati). c) Coperchio non riscaldato, base riscaldata a 38.5°C : all'interno della cameretta si raggiunge una temperatura di 37°C che viene mantenuta nel tempo, ma si forma una grande quantità di condensa.

4.2.4 Parametri di stretching utilizzati

I parametri dinamici controllabili durante la coltura in bioreattore del supporto cellularizzato hanno compreso ampiezza di deformazione, tensione (max/min) applicata e frequenza di stiramento. La letteratura disponibile è piuttosto povera di informazioni specifiche, che è inoltre difficile uniformare per la loro grande variabilità, legata alla tipologia di bioreattore impiegato, alle proprietà chimico-fisiche dello scaffold sollecitato e alle caratteristiche della linea cellulare utilizzata. I relativi valori sono quindi stati selezionati empiricamente, mediante valutazione sperimentale sul campo della loro sostenibilità rispetto ai requisiti minimi di non indurre condizioni di sofferenza cellulare e/o degradazione dello scaffold. Per esempio, una frequenza di stiramento eccessiva può determinare il distacco delle cellule dalla matrice polimerica dove erano state seminate, come mostrato in figura 4.15, così come tensioni di stiramento troppo elevate possono provocare la perdita di elasticità – ovvero la rottura – dello scaffold.

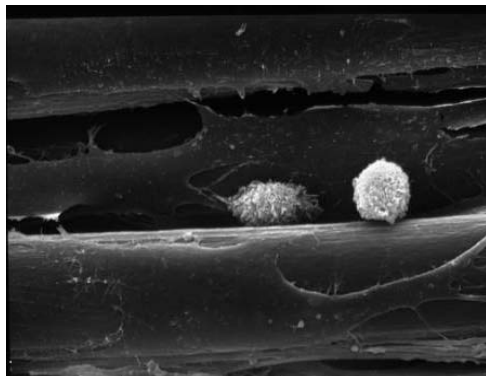


Fig. 4.15: MSC su HYAFF-11®

Lo schema che segue riassume la combinazione dei valori dei parametri finalmente utilizzata per gli esperimenti.

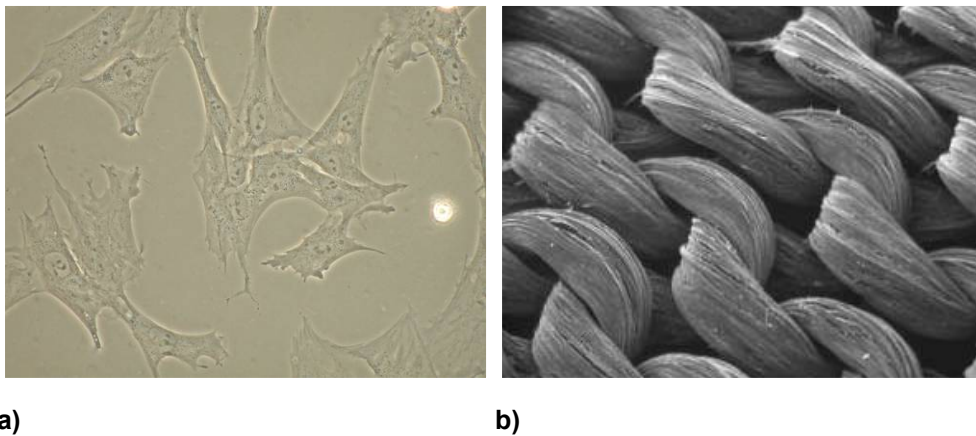
- Ampiezza di deformazione (mm) \leq 10% lunghezza scaffold
- Tensione max applicata (diastole) = 0,1 Newton (N)
- Tensione min applicata (sistole) = 0,05 N
- Frequenza di stiramento = 600 ms (100 bpm; 1,66 Hz)

4.3 Coltura statica e dinamica

4.3.1 Studi di crescita cellulare di MSCs di ratto su HYAFF-11[®]

Uno *stretch* uniassiale, generato dal prototipo di bioreattore, può essere trasmesso all'intera popolazione in coltura solo se questa è seminata su un biomateriale deformabile ed elastico, che abbia una struttura in grado di sostenere nel tempo uno stiramento controllato.

Quindi, per indirizzare cellule indifferenziate verso l'acquisizione in vitro di caratteri fenotipici vicini a quelli delle cellule muscolari, in questo studio cellule staminali mesenchimali di ratto sono state seminate su HYAFF-11[®] rete (cortesia di Fidia Advanced Biopolymers9 (fig. 4.16).



a) b)
Fig. 4.16: a) MSCs di ratto; b) HYAFF-11[®] rete.

Le MSCs sono state seminate a densità variabili ($0,2 - 0,5 - 1 \times 10^6$ cellule per cm^2 di HYAFF-11[®] utilizzato) e la cellularità dello pseudotessuto ottenuto è stata valutata attraverso la marcatura delle cellule con il fluorocromo vitale carbossi-fluoresceina-diacetato succinimidil estere (CFDA SE) (fig. 4.17), mentre la vitalità e crescita cellulare è stata valutata nei tre casi utilizzando il test MTT (fig. 4.18). I risultati ottenuti evidenziano come la semina di 1×10^6 cellule per cm^2 determini, rispetto alle altre condizioni, non solo un grado di adesione alle fibre maggiore, ma anche una proliferazione cellulare superiore, proponendosi come concentrazione di semina ideale nella preparazione di uno pseudotessuto in grado di sostenere sollecitazioni meccaniche cicliche in bioreattore.

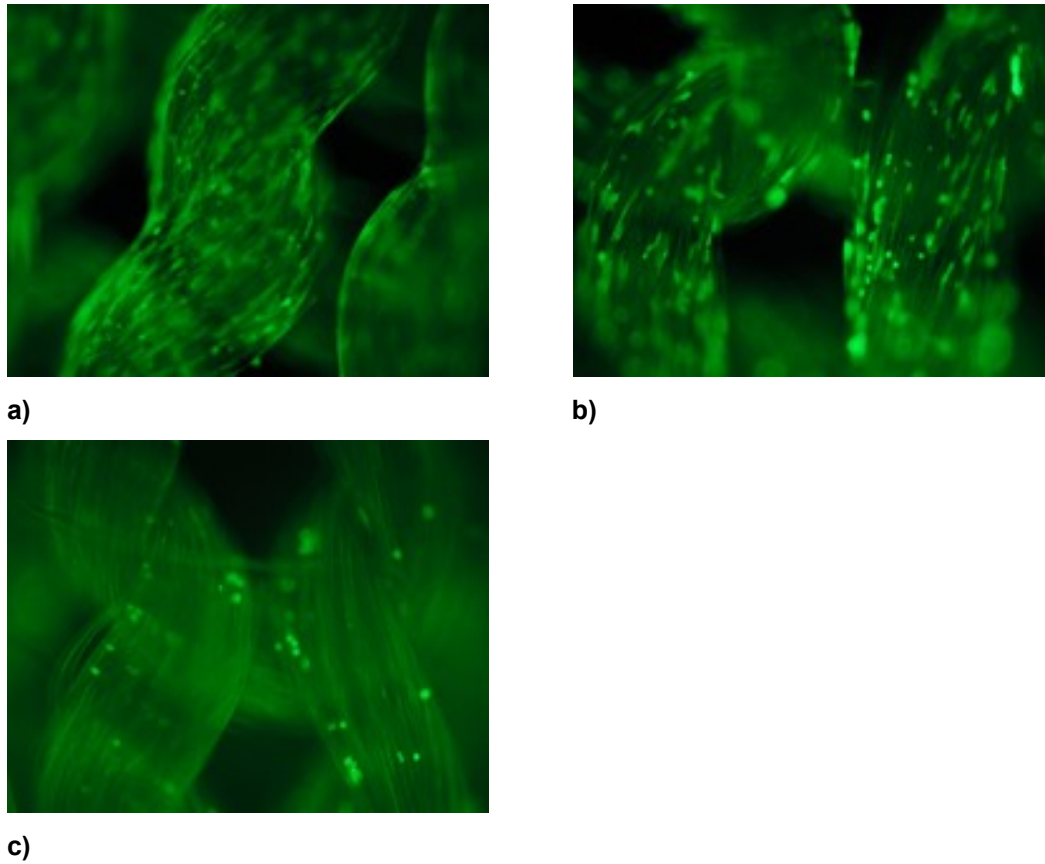


Fig. 4.17: Colorazione con CFDA SE: a) 1×10^6 cell /cm²; b) 0.5×10^6 cell /cm²; c) 0.2×10^6 cell /cm²

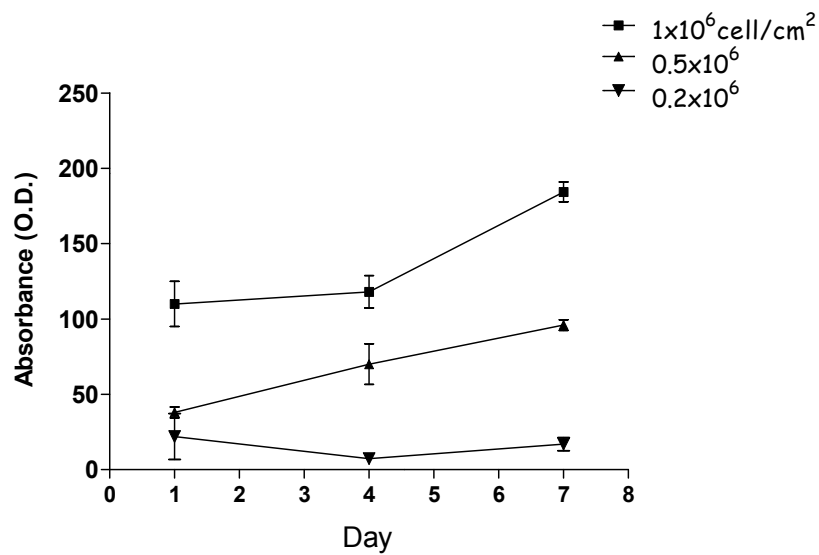


Fig. 4.18: Curve di crescita di MSCs su HYAFF-11[®] rete

4.3.2 Analisi istocitomorforologiche dei costrutti ingegnerizzati

In ogni singolo esperimento (n=4) le MSCs sono state coltivate alla stessa densità parallelamente su due differenti patch di HYAFF-11[®] rete. Gli scaffold con a bordo le cellule sono stati poi trattati in due modi diversi: uno di essi è stato lasciato in incubatore normale per due settimane (modello statico) mentre l'altro è stato mantenuto in condizioni statiche per una settimana e poi trasferito nella camera del bioreattore per essere sottoposto ad una stimolazione meccanica della durata di 7 giorni (modello dinamico).

I parametri cinetici e di coltura cellulare applicati sono stati i seguenti:

- Dimensione utile (L x H) dello HYAFF-11[®] seminato = 30 x 30 mm
- Densità cellulare = $1 \times 10^6 \text{ cell/cm}^2$
- Tensione max applicata (equivalente a un valore sistolico) = 0,1 N Tensione min applicata (equivalente a un valore diastolico) = 0,05 N
- Frequenza di stiramento = 600 ms (100 bpm; 1,66 Hz)
- Temperatura = 37 °C
- pH del terreno di coltura = 7,32 (tampone HCO₃ equilibrato con CO₂ atmosferico)

La cellularità dello pseudotessuto è stata quindi valutata in parallelo nei campioni coltivati in condizioni statiche e dinamiche ancora una volta attraverso la marcatura delle cellule con il fluorocromo vitale CFDA SE.

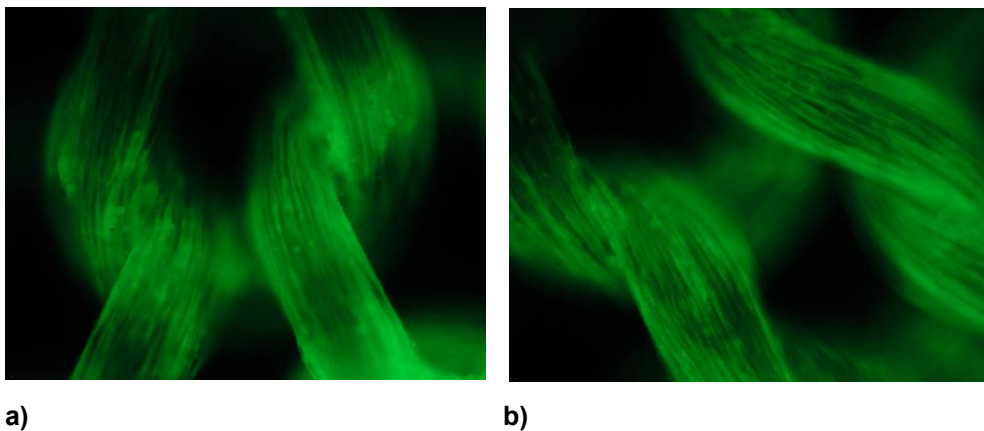


Fig. 4.19: a) Coltura statica; b) Coltura dinamica.

La fluorescenza osservata al microscopio ha dimostrato che dopo 7 giorni di

coltura dinamica le MSCs risultavano ancora vitali ed adese alle fibre dello HYAFF-11[®] (fig. 4.19b) Per questo motivo al termine di ogni prova sperimentale (durata complessiva 14 gg) i costrutti ingegnerizzati sono stati analizzati (Dipartimento di Scienze Radiologiche e Istocitopatologiche; Prof. G. Pasquinelli) in microscopia ottica ed elettronica a scansione (SEM) e a trasmissione (TEM) presso il Dipartimento di Scienze Radiologiche e Istocitopatologiche (Prof. G. Pasquinelli).

Le analisi istologiche, eseguite sui campioni colorati in ematossilina/eosina hanno mostrato che in condizioni dinamiche si determina una maggiore penetrazione cellulare attraverso le fibre di HYAFF-11[®]. Le MSCs, inoltre, tendono ad assumere in queste condizioni un'organizzazione multistrato, chiaramente differente dall'aspetto monocellulare della proliferazione in condizioni colturali statiche (fig. 4.20).

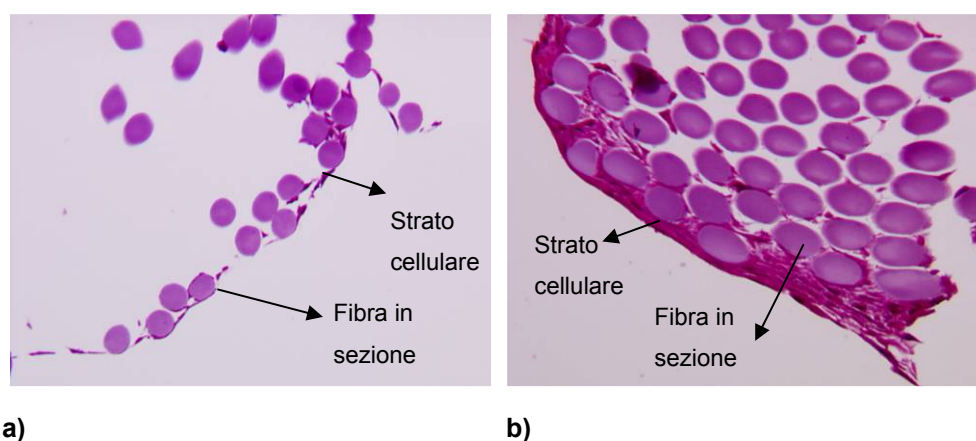
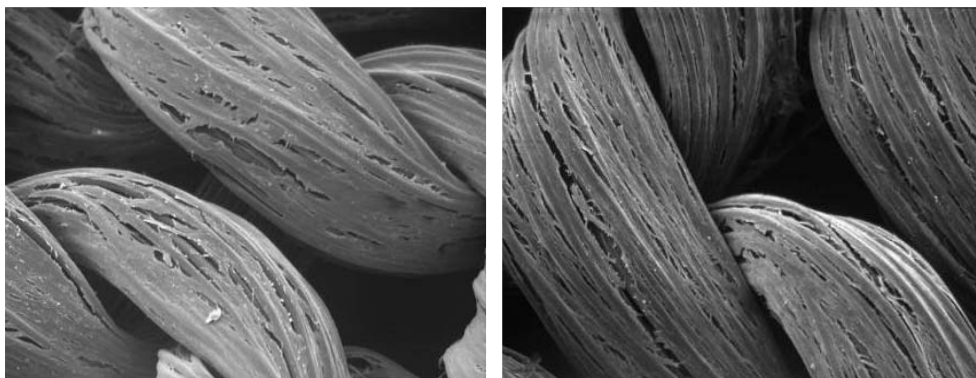


Fig. 4.20: Colorazione EE: a) Modello statico; b) modello dinamico.

La SEM (come mostrato in fig. 4.21) ha confermato che nelle condizioni di controllo statico le cellule ricoprono la superficie dello scaffold mostrando un caratteristico aspetto a lenzuolo con evidenti contatti intercellulari e formazione di matrice extracellulare. A seguito dello stimolo dinamico le cellule hanno acquistato una disposizione orientata lungo l'asse longitudinale delle fibre di HYAFF-11[®] soggetto alla trazione da parte del motore lineare che equipaggia il bioreattore.



a)

b)

Fig. 4.21: SEM: a) Modello statico; b) Modello dinamico.

Le analisi citomorfologiche in TEM hanno descritto un'effettiva variazione del citoscheletro delle cellule sottoposte allo stress meccanico. Queste hanno infatti mostrato un aumento della componente citoplasmatica riferibile all'actina filamentosa, della matrice extracellulare e della densità delle giunzioni intercellulari.

Nella figura 4.22 è riportata un'immagine ottenuta al TEM di una MSC derivante dal modello statico. Essa appare caratterizzata da un elevato rapporto Nucleo/Citoplasma (N/C) con evidente attività cromatinica e nucleolo (Nu) ben sviluppato, ma risulta priva di filamenti contrattili e depositi di matrice extracellulare.

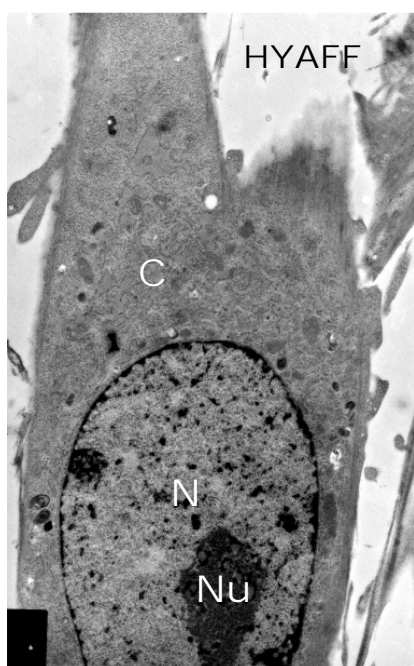


Fig. 4.22: TEM modello statico.

Le immagini della figura 4.23 ottenute con la TEM si riferiscono a cellule coltivate nel modello dinamico ed evidenziano l'efficacia del tipo di coltura nel produrre un adattamento delle MSCs alle condizioni dinamiche.

Le cellule risultano infatti ricche di filamenti contrattili (FC) di actina tanto spessi da formare sia una sorta di "guscio" esterno (GE) che una diramazione interna (DI) in grado di estendersi attraverso il citoplasma come mostrato nella Fig. 4.23c.

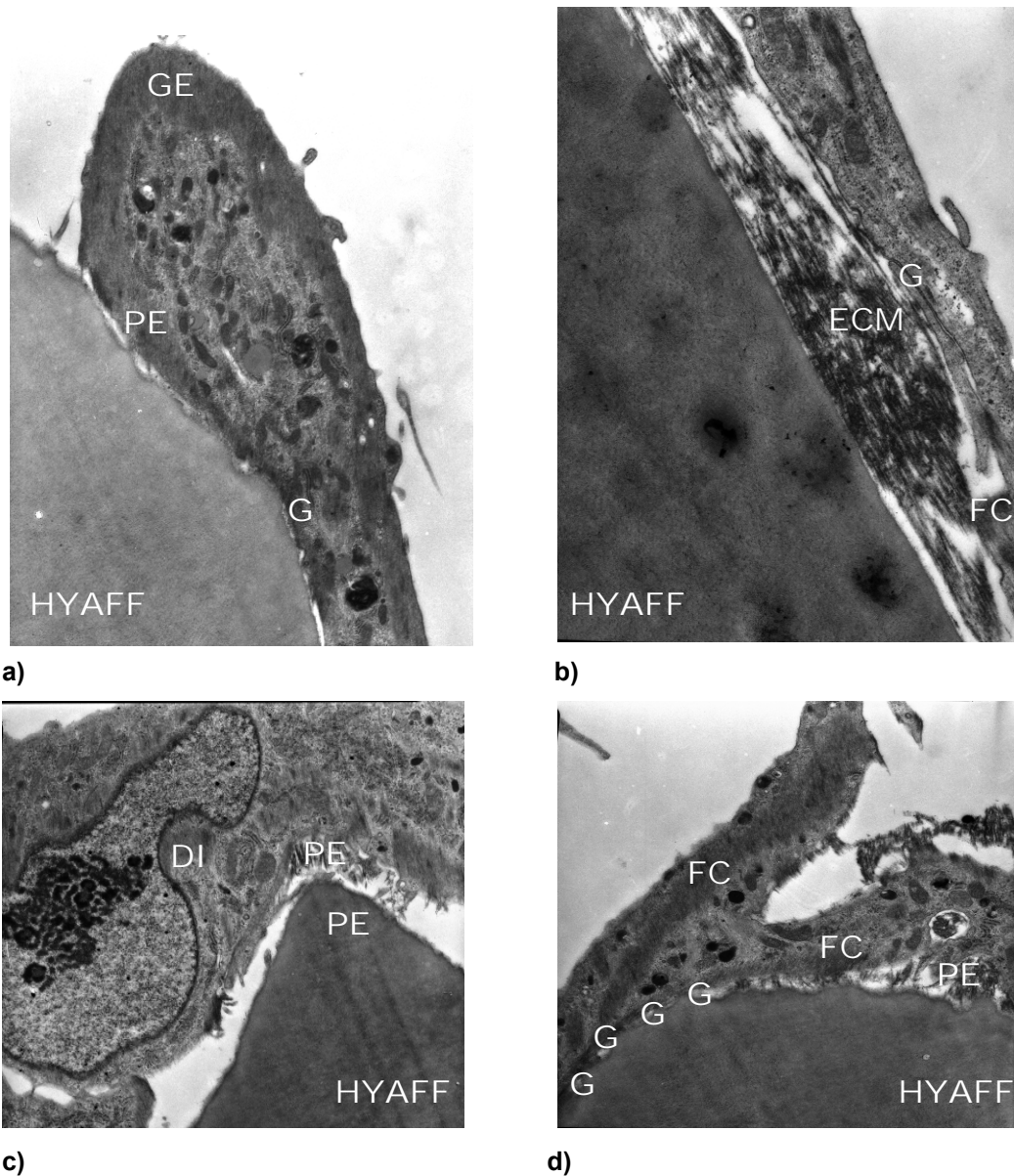


Fig. 4.23: TEM. a) Modello dinamico; b) particolare di matrice extracellulare di MSC adesa a HYAFF; c) Diramazione interna di filamenti contrattili di actina (DI); d) Giunzioni focali (G).

Le MSCs, inoltre, si ancorano alle fibre di HYAFF mediante ponti/piloni extracellulari (PE) e formano giunzioni (G) focali cellula-cellula (fig. 4.23d) che

contribuiscono a conferire alle cellule stesse un tipico aspetto muscolare.

Le analisi immunoistochimiche di sezioni degli pseudotessuti, eseguite con anticorpi primari specifici diretti rispettivamente (fig. 4.24) verso fibronectina, actina citoplasmatica e connessina-43, hanno messo in luce una maggiore espressione di quest'ultime, in modo particolare dell'actina, nelle cellule stimulate meccanicamente all'interno del bioreattore, confermando ulteriormente l'efficacia della coltura dinamica nel determinare una variazione della struttura citoscheletrica delle MSCs.

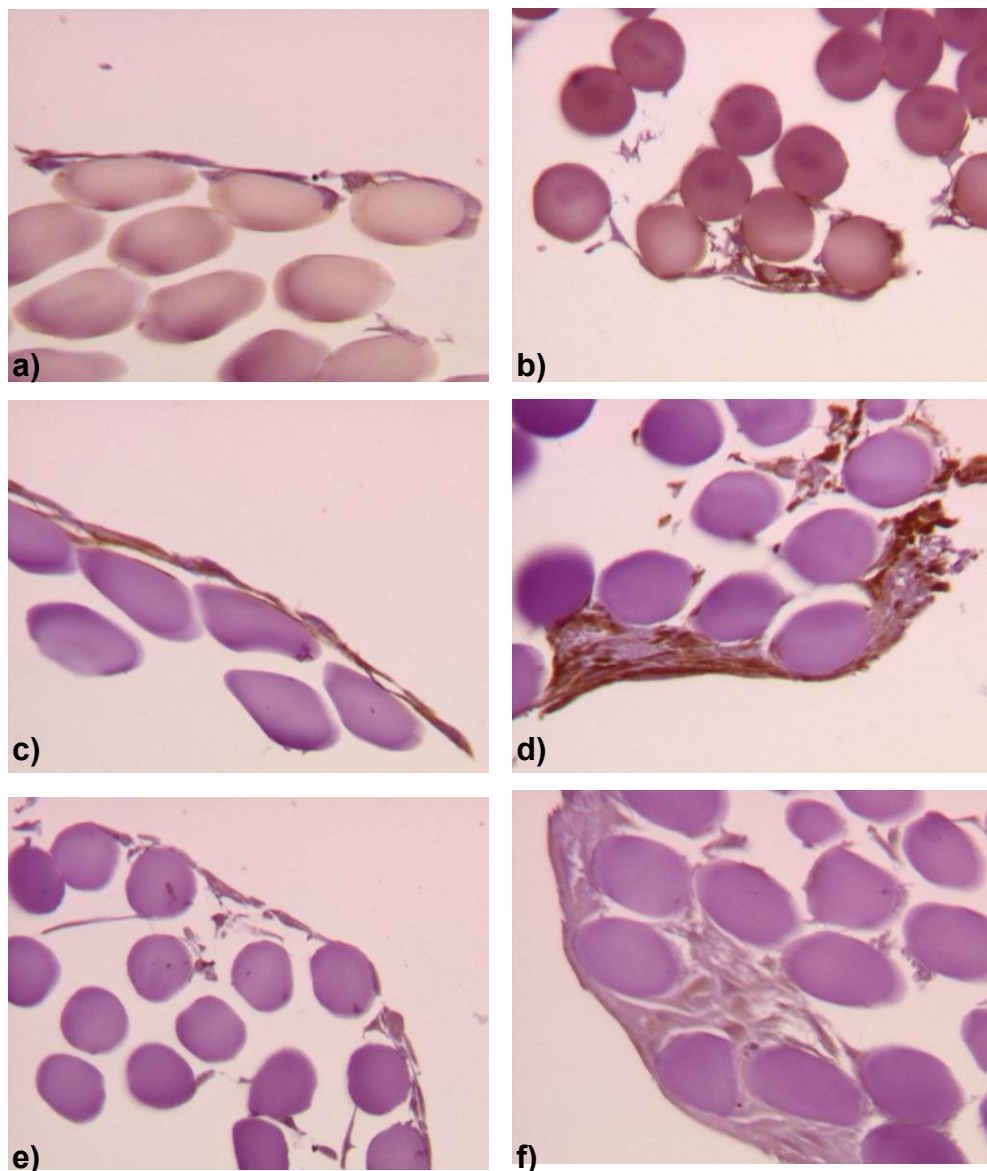


Fig. 4.24: Immunoistochimica. Fibronectina: a) statico; b) dinamico; Actina: c) statico; d) dinamico; Connexina-43: e) statico; f) dinamico.

4.3.3 Estrazione di proteine ed RNA totali da cellule adese a scaffold

Per l'estrazione del contenuto di proteine e acidi nucleici dalle cellule adese agli scaffold sono stati parzialmente modificati i protocolli operativi di uso abituale nelle configurazioni colturali standard.

Di seguito gli schemi procedurali messi a punto per l'estrazione di proteine (A) ed RNA (B) da cellule cresciute su HYAFF-11[®], ovvero su PLLA e PPDL:

(A)

1. Eliminazione del terreno di coltura e lavaggio dello pseudotessuto in PBS.
2. Utilizzo di 150-200 μ L di tampone di lisi (DTT 5 mM, EDTA 2 mM, CHAPS 0.1 %, Triton 0.1 %, PMSF 1 mM) per cm^2 di scaffold.
3. Degradazione dello pseudotessuto in tampone di lisi mediante impiego di un mini-potter.
4. Sonicazione dell'omogenato ottenuto alla frequenza di 38 kHz per 5 min.
5. Centrifugazione dell'omogenato a 12000 per 10 min a 4 °C.
6. Utilizzo del sovranatante per il dosaggio di proteine secondo il metodo Bradford.

Dopo aver eseguito il dosaggio delle proteine il sovrinatante è stato diluito in Loading Buffer in modo da ottenere campioni da analizzare mediante Western Blotting (pag. 48).

(B)

1. Eliminazione del terreno di coltura e lavaggio dello pseudotessuto in PBS
2. Utilizzo di 1 mL di Trizol Reagent per cm^2 di scaffold.
3. Seguire il protocollo di estrazione tradizionale (pag. 48)

La figura 4.25 mostra due esempi di risultati ottenuti in western blotting e RT-PCR, rispettivamente, da pseudotessuti costituiti da MSCs e HYAFF-11 rete coltivati in condizioni statiche, ed evidenzia la possibilità di ottenere segnali adeguati privi di interferenze derivanti dal biomateriale costituenti lo scaffold sul quale le cellule erano adese.

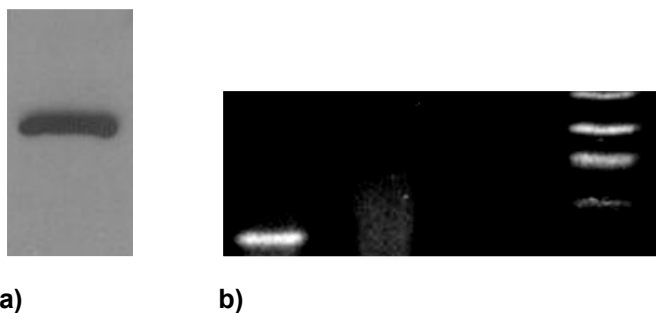


Fig. 4.25: a) Banda di β -actina rivelata tramite western blotting; b) Banda di GAPDH rivelata tramite RT-PCR.

Sulla base di questi risultati è giustificato l'ottimismo sulla fattibilità di un'analisi molecolare dettagliata del corredo di proteine e messaggeri specifici per il fenotipo muscolare cardiaco nelle cellule staminali in coltura dinamica, che viene avviata mentre questo manoscritto è in corso di stesura.

5 – CONCLUSIONI

Nell'ambito dell'ingegneria dei tessuti, la possibilità di rigenerazione del miocardio post-infartuale è un argomento “caldo”, che suscita grandi speranze ma solleva altrettanto grandi interrogativi - sostenuti dal sussistere di dubbi di base sulle scelte operative praticabili. Esiste tuttavia concordanza nel considerare fondamentale l'utilizzo di un “supporto” che possa mantenere nella sede peri-infartuale le cellule competenti. Infatti, la semplice iniezione di cellule staminali per via endovenosa o direttamente nell'area infartuata non si è dimostrata particolarmente efficace, soprattutto a causa della cospicua perdita cellulare che si verifica rapidamente dopo il trapianto. Ci si orienta quindi verso la strategia di seminare cellule in grado di transdifferenziare in senso muscolare cardiaco su un materiale biocompatibile *in vitro* e di impiantare successivamente il costruito ottenuto *in vivo* dove ci si attende il riassorbimento del biomateriale e l'integrazione delle cellule. Tuttavia, mentre in altri settori della medicina - quali ortopedia e dermatologia - l'impiego di pseudotessuti ingegnerizzati ha già permesso di conseguire ottimi risultati nella rigenerazione di tessuti danneggiati, allo stato attuale, i progressi ottenuti nell'ambito della rigenerazione del miocardio infartuato appaiono ancora aneddotici e distanti dall'ottenere protocolli condivisi per l'impiego in clinica.

Il lavoro presentato in questa ricerca, condotto grazie alla sinergia di competenze interdisciplinari negli ambiti chimico, biologico e dell'ingegneria biomedica meccanica ed elettronica, è uno studio di fattibilità di una metodica standardizzata in grado di indirizzare cellule staminali mesenchimali (MSCs) indifferenziate verso l'acquisizione *in vitro* di caratteri fenotipici confrontabili con quelli delle cellule muscolari cardiache attraverso il paradigma della coltura dinamica in bioreattore.

Il prototipo di bioreattore impiegato, in quanto sviluppato originalmente nel corso di questa attività di ricerca, presenta rispetto ad altri strumenti descritti l'innovazione e il vantaggio di non richiedere l'utilizzo di un incubatore, in quanto esso stesso permette di coltivare cellule al suo interno in condizioni controllate di temperatura, pH e concentrazione di CO₂. La sua flessibilità operativa consente di impostare e controllare da *personal computer* leggi di moto di qualsiasi forma anche con cicliche molto veloci. Infine, la presenza di estensimetri in grado di misurare

finemente la variazione di tensione esercitata sulla matrice polimerica utilizzata, posta in trazione tra due afferraggi, permette di applicare nel tempo una forza di stiramento costante, ottenendo deformazioni controllate e risultati riproducibili in termini di modificazioni cellulari.

Il superamento delle problematiche sorte durante la fase di messa a punto del sistema, che deve essere ritenuto parte integrante del lavoro di sviluppo condotto, ha permesso di studiare l'adattamento di MSCs allo stiramento ciclico, mostrando che questo effettivamente determina alcune differenze fenotipiche rispetto al controllo statico. Inoltre le cellule hanno acquistato una disposizione orientata lungo l'asse longitudinale delle fibre, dato questo particolarmente importante se si considera la disposizione ordinata delle cellule del miocardio, le quali costituiscono un vero e proprio sincizio, indispensabile per una diffusione sincrona dell'impulso elettrico di contrazione. La creazione di uno pseudotessuto cardiaco ottimale richiederà ovviamente ulteriore lavoro, ma la metodica qui presentata si propone al tempo stesso come uno strumento di studio e come una strategia operativa per un approccio innovativo e standardizzabile alla medicina rigenerativa del miocardio.

BIBLIOGRAFIA

1. Adams, R.J., et al., *Update to the AHA/ASA Recommendations for the Prevention of Stroke in Patients With Stroke and Transient Ischemic Attack*. Stroke, 2008. 39(5): p. 1647-1652.
2. Istituto Nazionale di Statistica, www.istat.it.
3. McCarthy, P.M., *Surgical Therapies for Post-Myocardial Infarction Patients*. The American Journal of Cardiology, 2008. 102(5, Supplement 1): p. 42G-46G.
4. Ross Naylor, A., Z. Mehta, and P.M. Rothwell, *A Systematic Review and Meta-analysis of 30-Day Outcomes Following Staged Carotid Artery Stenting and Coronary Bypass*. European Journal of Vascular and Endovascular Surgery.
5. Mann, D.L., *Mechanisms and models in heart failure: A combinatorial approach*. Circulation, 1999. 100(9): p. 999-1008.
6. Jameel, M.N. and J. Zhang, *Heart Failure Management: Present and The Future*. Antioxidants & Redox Signaling. .
7. Mann, D.L. and M.R. Bristow, *Mechanisms and models in heart failure: the biomechanical model and beyond*. Circulation, 2005. 111(21): p. 2837-49.
8. Krupnick, A.S., et al., *Myocardial tissue engineering and regeneration as a therapeutic alternative to transplantation*. Curr Top Microbiol Immunol, 2004. 280: p. 139-64.
9. Lavik, E. and R. Langer, *Tissue engineering: current state and perspectives*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2004. 65(1): p. 1-8.
10. Gerecht-Nir, S., et al., *Biophysical regulation during cardiac development and application to tissue engineering*. Int J Dev Biol, 2006. 50(2-3): p. 233-43.
11. Teebken OE, K.T., Akhyari P, Haverich A., *Tissue engineering: in vitro creation of tissue substitutes*. Zentralbl Chir 2007. 132(3): p. 236-46.
12. Dutta, R.C. and A.K. Dutta, *Cell-interactive 3D-Scaffold; advances and applications*. Biotechnology Advances.
13. Kawakami, H., *Polymeric membrane materials for artificial organs*. Journal of Artificial Organs, 2008. 11(4): p. 177-181.

14. Rezwan, K., et al., *Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering*. Biomaterials, 2006. 27(18): p. 3413-3431.
15. Griffith, L.G. and G. Naughton, *Tissue Engineering--Current Challenges and Expanding Opportunities*. Science, 2002. 295(5557): p. 1009-1014.
16. Prockop, D.J., *Marrow stromal cells as stem cells for non haematopoietic tissues*. Science, 1997. 276: p. 71-74.
17. Morrison, S.J., N.M. Shah, and D.J. Anderson, *Regulatory mechanisms in stem cell biology*. Cell, 1997. 88(3): p. 287-98.
18. Thomson, J.A., et al., *Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts*. Science, 1998. 282(5391): p. 1145-7.
19. Doetschman, T.C., et al., *The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium*. J Embryol Exp Morphol, 1985. 87: p. 27-45.
20. Lucas, J. and N. Terada, *Cell fusion and plasticity*. Cytotechnology, 2003. 41(2): p. 103-109.
21. Strubing, C., et al., *Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into the neuronal lineage in vitro gives rise to mature inhibitory and excitatory neurons*. Mech Dev, 1995. 53(2): p. 275-87.
22. Wartenberg, M., et al., *The embryoid body as a novel in vitro assay system for antiangiogenic agents*. Lab Invest, 1998. 78(10): p. 1301-14.
23. Rohwedel, J., et al., *Muscle cell differentiation of embryonic stem cells reflects myogenesis in vivo: developmentally regulated expression of myogenic determination genes and functional expression of ionic currents*. Dev Biol, 1994. 164(1): p. 87-101.
24. Wobus, A.M., *Potential of embryonic stem cells*. Mol Aspects Med, 2001. 22(3): p. 149-64.
25. Hescheler, J., et al., *Embryonic stem cells: a model to study structural and functional properties in cardiomyogenesis*. Cardiovasc Res, 1997. 36(2): p. 149-62.
26. Klug, M.G., et al., *Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts*. J Clin Invest, 1996. 98(1): p. 216-24.

27. Min, J.Y., et al., *Transplantation of embryonic stem cells improves cardiac function in postinfarcted rats*. J Appl Physiol, 2002. 92(1): p. 288-96.
28. Clarke, D.L., et al., *Generalized potential of adult neural stem cells*. Science, 2000. 288(5471): p. 1660-3.
29. Ying, Q.L., et al., *Changing potency by spontaneous fusion*. Nature, 2002. 416(6880): p. 545-8.
30. Terada, N., et al., *Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion*. Nature, 2002. 416(6880): p. 542-5.
31. Bhatia, M., et al., *Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immune-deficient mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. 94(10): p. 5320-5.
32. Gage, F.H., *Mammalian neural stem cells*. Science, 2000. **287**(5457): p. 1433-8.
33. Watt, F.M., *Stem cell fate and patterning in mammalian epidermis*. Curr Opin Genet Dev, 2001. 11(4): p. 410-7.
34. Pittenger, M.F. and B.J. Martin, *Mesenchymal Stem Cells and Their Potential as Cardiac Therapeutics*. Circ Res, 2004. 95(1): p. 9-20.
35. Daniels, J.T., et al., *Corneal stem cells in review*. Wound Repair Regen, 2001. 9(6): p. 483-94.
36. Rafii, S., et al., *Isolation and characterization of human bone marrow microvascular endothelial cells: hematopoietic progenitor cell adhesion*. Blood, 1994. 84(1): p. 10-9.
37. Kim, H., et al., *Cell Therapy with Bone Marrow Cells for Myocardial Regeneration*. Antioxidants & Redox Signaling.
38. Onderzoeksgroep Biomaterialen, V.O.C., Faculteit Wetenschappen--UGent, Krijgslaan, *Biomaterials*. Verh K Acad Geneesk Belg, 2004. 66(4): p. 242-5.
39. Ratner, B.D. and S.J. Bryant, *Biomaterials: Where We Have Been and Where We are Going*. Annual Review of Biomedical Engineering, 2004. 6(1): p. 41-75.
40. Andrade, J.D., *Biomaterials: applications----innovations----principles: the contributions of C. William Hall*. J Biomed Mater Res, 1985. 19(9): p. 981-6.

41. Erin R. Ochoa, J.P.V., *An Overview of the Pathology and Approaches to Tissue Engineering*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2002. 979 Lymphatic Biology and Disease: p. 10-26.
42. Vert, M., *Aliphatic polyesters: great degradable polymers that cannot do everything*. Biomacromolecules, 2005. 6(2): p. 538-46.
43. Middleton, J.C. and A.J. Tipton, *Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices*. Biomaterials, 2000. 21(23): p. 2335-2346.
44. Pörtner, R., et al., *Bioreactor design for tissue engineering*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2005. 100(3): p. 235-245.
45. Martin, I., D. Wendt, and M. Heberer, *The role of bioreactors in tissue engineering*. Trends in Biotechnology, 2004. 22(2): p. 80-86.
46. Chen, H.-C. and Y.-C. Hu, *Bioreactors for tissue engineering*. Biotechnology Letters, 2006. 28(18): p. 1415-1423.
47. J.S. Stephens, et al., *Perfusion flow bioreactor for 3D in situ imaging: Investigating cell/biomaterials interactions*. Biotechnology and Bioengineering, 2007. 97(4): p. 952-961.
48. Philippe Sucosky, et al., *Fluid mechanics of a spinner-flask bioreactor*. Biotechnology and Bioengineering, 2004. 85(1): p. 34-46.
49. Zhang, Z.-Y., et al., *A biaxial rotating bioreactor for the culture of fetal mesenchymal stem cells for bone tissue engineering*. Biomaterials.
50. Akhyari, P., et al., *Mechanical Stretch Regimen Enhances the Formation of Bioengineered Autologous Cardiac Muscle Grafts*. Circulation, 2002. 106(90121): p. I-137-142.
51. Melissa A. Brown, R.K.I.M.R., *Pulsatile perfusion bioreactor for cardiac tissue engineering*. Biotechnology Progress, 2008. 24(4): p. 907-920.
52. Feng Z, M.T., Nomura Y, Nakamura T., *An electro-tensile bioreactor for 3-D culturing of cardiomyocytes. A bioreactor system that simulates the myocardium's electrical and mechanical response in vivo*. IEEE Eng Med Biol Mag. , 2005. 24(4): p. 73-9.
53. Selbert, S. and W.M. Franz, *Myocardial tissue engineering*. Ernst Schering Res Found Workshop, 2002(35): p. 47-66.
54. Eschenhagen, T. and W.H. Zimmermann, *Engineering myocardial tissue*. Circ Res, 2005. 97(12): p. 1220-31.

55. Birla, R.K., et al., *Myocardial engineering in vivo: formation and characterization of contractile, vascularized three-dimensional cardiac tissue*. Tissue Eng, 2005. 11(5-6): p. 803-13.
56. Liu, M., et al., *Bio-stretch, a computerized cell strain apparatus for three-dimensional organotypic cultures*. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 1999. 35(2): p. 87-93.
57. Leor, J. and S. Cohen, *Myocardial tissue engineering: creating a muscle patch for a wounded heart*. Ann N Y Acad Sci, 2004. 1015: p. 312-9.
58. Friedenstein, A.J., J.F. Gorskaja, and N.N. Kulagina, *Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs*. Exp Hematol, 1976. 4(5): p. 267-74.
59. Sottile, V., et al., *Stem cell characteristics of human trabecular bone-derived cells*. Bone, 2002. 30(5): p. 699-704.
60. Martins, A., et al., *Electrospun nanostructured scaffolds for tissue engineering applications*. Nanomedicine, 2007. 2(6): p. 929-942.
61. Liang, D., B.S. Hsiao, and B. Chu, *Functional electrospun nanofibrous scaffolds for biomedical applications*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2007. 59(14): p. 1392-1412.
62. Xu C, I.R., Kotaki M, Ramakrishna S., *Electrospun nanofiber fabrication as synthetic extracellular matrix and its potential for vascular tissue engineering*. Tissue Eng., 2004. 10(7-8): p. 1160-8.
63. Wei He, et al., *Tubular nanofiber scaffolds for tissue engineered small-diameter vascular grafts*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2008.
64. Hideto, T., *Poly(lactide) Stereocomplexes: Formation, Structure, Properties, Degradation, and Applications*. Macromolecular Bioscience, 2005. 5(7): p. 569-597.
65. Sangsanoh, P., et al., *In Vitro Biocompatibility of Schwann Cells on Surfaces of Biocompatible Polymeric Electrospun Fibrous and Solution-Cast Film Scaffolds*. Biomacromolecules, 2007. 8(5): p. 1587-1594.
66. G. Pasquinelli, et al., *Mesenchymal stem cell interaction with a non-woven hyaluronan-based scaffold suitable for tissue repair*. Journal of Anatomy, 2008. 213(5): p. 520-530.

67. Zavan B, et al., *New 3D hyaluronan-based scaffold for in vitro reconstruction of the rat sciatic nerve*. Neurol Res., 2008. 30(2): p. 190-6.
68. Page, B., *A new fluorometric assay for cytotoxicity measurements in vitro*. Int. J. of Oncology, 1993. 3: p. 473-476.
69. Denizot, F. and R. Lang, *Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability*. J Immunol Methods, 1986. 89(2): p. 271-7.
70. Hoefel, D., *A comparative study of carboxyfluorescein diacetate and carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester as indicators of bacterial activity*. J. Microbiol. Methods, 2003. 52: p. 379-388.
71. Vichai, V. and K. Kirtikara, *Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening*. Nat. Protocols, 2006. 1(3): p. 1112-1116.
72. Zanella, B., *Nitric oxide synthase activity in rat cardiac mitochondria*. Basic Res Cardiol, 2004. 99: p. 159-164.
73. Grandi, E., *Induction of NO synthase 2 in ventricular cardiomyocytes incubated with a conventional bicarbonate dialysis bath*. Nephrol Dial Transplant, 2008. 23: p. 2192-2197.
74. Van der Meulen, I., et al., *Polymers from Functional Macrolactones as Potential Biomaterials: Enzymatic Ring Opening Polymerization, Biodegradation, and Biocompatibility*. Biomacromolecules, 2008. 9(12): p. 3404-3410.
75. Kitsie J. Penick, et al., *Performance of polyoxymethylene plastic (POM) as a component of a tissue engineering bioreactor*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2005. 75A(1): p. 168-174.
76. Jennifer A. Laluppa, et al., *Culture materials affect *ex vivo* expansion of hematopoietic progenitor cells*. Journal of Biomedical Materials Research, 1997. 36(3): p. 347-359.

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio la Compagnia di San Paolo (TO) per aver finanziato la presente ricerca e Fidia Advanced Biopolymers per la fornitura di HYAFF-11[®] rete.

Ringrazio inoltre i colleghi delle varie unità operative che, con il loro aiuto e sostegno, mi hanno permesso di condurre questo studio, in particolare:

Dipartimento di Biochimica “G. Moruzzi” e INRC: Dott. E. Giordano, Prof. C.M. Caldarera, Prof. C. Muscari, Prof. C. Guarnieri, Dott.ssa F. Danesi, Dott.ssa F. Bonafè, Dott.ssa C. Gamberini, Dott. M. Carboni, Dott.ssa S. Cetrullo, Dott.ssa E. Fiumana, Dott. G. Agnetti, M. Sgarbi, Dott.ssa I. Basile.

Dipartimento di Scienze Radiologiche e Istocitopatologiche: Prof. G. Pasquinelli, Dott.ssa L. Foroni, Dott.ssa C. Orrico, Dott.ssa S. Valente.

Dipartimento di Chimica “G. Ciamician”: Prof. M. Scandola, Dott.ssa M. Focarete, Dott.ssa C. Gualandi.

Dipartimento di Elettronica, Informatica e Sistemistica (DEIS): Prof. S. Cavalcanti, Ing. L. Biagiotti, A. Sabbioni, M. Lanocca.

Dipartimento di Ingegneria delle Costruzioni Meccaniche, Nucleari, Aeronautiche e di Metallurgia (DIEM): Ing. A. Zucchelli, Ing. F. Lotti.